



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICO DE QUERATINA OBTENIDA DE
RESIDUOS DE PLUMAS DE AVES DE CORRAL Y QUITOSANO.

Autor

Areli Luzmila Abril Garófalo

Año

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICO DE QUERATINA OBTENIDA DE
RESIDUOS DE PLUMAS DE AVES DE CORRAL Y QUITOSANO.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y
Remediación.

Profesor Guía
MSc. Daniel Hernán Hidalgo Villalba

Autora
Arelis Luzmila Abril Garófalo

Año
2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Elaboración de bioplástico de queratina obtenida de residuos de plumas de aves de corral y quitosano, a través de reuniones periódicas con el estudiante (nombres completos del estudiante), en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Daniel Hernán Hidalgo Villalba

Magister en Ciencias de la Ingeniería Especialización Ingeniería Ambiental

CI. 180191444-9

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Elaboración de bioplástico de queratina obtenida de residuos de plumas de aves de corral y quitosano, del Arelis Luzmila Abril Garófalo, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



Indira Fernandina Black Solís

Magister en Conservación y Gestión del Medio Natural

CI. 171127356-3

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes."



Arelis Luzmila Abril Garófalo

CI. 1725948051

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Magister Daniel Hernán Hidalgo Villaba, a la Magister Indira Fernandina Black Solís y al Master Miguel Gualoto por la apertura, colaboración, y su guía en la ejecución de la presente investigación. A mi madre por ser un apoyo incondicional y punto clave en todo mi proceso educativo, además de ser un modelo para seguir durante todos estos años, para poder culminar mis estudios

RESUMEN

El presente proyecto consistió en la elaboración de plástico biodegradable a partir de la mezcla de quitosano comercial y queratina de aves. La queratina fue obtenida de residuos de plumas de aves de corral, a escala de laboratorio, mediante tratamientos de sulfuro de sodio, metabisulfito de sodio y una hidrólisis enzimática a un porcentaje del 0.075% de enzima KYZYME VP. Para selección de las biopelículas se trabajó con 15 mezclas diferentes de queratina y quitosano con su glicerina (como su agente plastificante). Posteriormente se realizaron pruebas de tracción físico mecánicas, para probar la fuerza de tracción de las nueve de las biopelículas seleccionadas, de acuerdo con la norma ASTM D882-10. Finalmente se realizaron dos pruebas de biodegradabilidad, una por medio de compostaje, la cual analizó la pérdida de peso, durante 15 días; y otra utilizando *Bacillus* sp. midiendo la absorbancia y la turbidez a las 72, 112, 144 y 168 horas, además, se determinó la pérdida de peso de las muestras a las 168 horas de experimentación.

La biopelícula con mejores propiedades físico-mecánicas de factor de rotura y fuerza de tensión, en mezcla de quitosano y queratina fue el A3B3C3 de 10% de queratina, 90% de quitosano con un agregado del 17% de glicerina, sin embargo, cuando se utilizó 100% de quitosano la película presentó una mejor tracción. La biodegradación de esta película fue de un 58.01% en 15 días de compostaje y una pérdida de peso de 0.333 g en la biodegradación microbiana de *Bacillus* sp, siendo mejor el proceso en degradación el compostaje sobre la degradación de microorganismos en tubos de ensayo.

El proceso más eficiente para la degradación del plástico biodegradable fue el tratamiento A2B2C3, con un 81.17% de pérdida de peso en el compostaje mientras que en la biodegradación microbiana el tratamiento con mayor pérdida de peso de 0.6333 gr y de una turbidez de 567.67 fue el A2B2C2.

Se concluye que la queratina baja considerablemente las propiedades físico-mecánicas del film en los tratamientos planteados, debido a que estas sustancias poseen un bajo factor de compatibilidad adicionando su diferencia considerable de pH al encontrarse en disolución.

ABSTRACT

The present project consisted of the elaboration of biodegradable plastic from the mixture of commercial chitosan and bird keratin. Keratin was obtained from poultry feather residues, on a laboratory scale, by means of sodium sulphide, sodium metabisulfite and enzymatic hydrolysis treatments at a percentage of 0.075% of KYZYME VP enzyme. For the selection of biofilms, 15 different mixtures of keratin and chitosan were used with their glycerin (as their plasticizing agent). Subsequently, mechanical physical tensile tests were performed to test the tensile strength of the nine of the selected biofilms, in accordance with ASTM D882-10. Finally, two biodegradability tests were carried out, one through composting, which analyzed the weight loss for 15 days; and another using *Bacillus* sp. measuring the absorbance and turbidity at 72, 112, 144 and 168 hours, in addition, the weight loss of the samples at 168 hours of experimentation was determined.

The biofilm with better physical-mechanical properties of breakage factor and tensile strength, in a mixture of chitosan and keratin was the A3B3C3 of 10% keratin, 90% chitosan with an aggregate of 17% glycerin, however, when used 100% chitosan the film showed better traction. The biodegradation of this film was 58.01% in 15 days of composting and a weight loss of 0.333 g in the microbial biodegradation of *Bacillus* sp, the composting process being better degraded on the degradation of microorganisms in test tubes.

The most efficient process for the degradation of biodegradable plastic was the A2B2C3 treatment, with 81.17% of weight loss in composting while in microbial biodegradation the treatment with the greatest weight loss of 0.6333 gr and a turbidity of 567.67 was the A2B2C2.

It is concluded that keratin considerably lowers the physical-mechanical properties of the film in the proposed treatments, because these substances have

a low compatibility factor by adding their considerable pH difference when they are in solution.

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General.....	4
1.2.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. Alcance:.....	4
1.4. Justificación:.....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Polímeros.....	6
2.2. Biopolímeros	6
2.3. Fuentes de producción de los biopolímeros.....	7
2.4. Clases de biopolímeros	8
2.4.1. Polímeros biodegradables naturales.....	8
2.4.2. Polímeros biodegradables sintéticos.....	9
2.5. Queratina	9
2.5.1. Fuentes de la queratina: estructura de las plumas.....	10
2.5.2. Métodos de obtención de la queratina	11
2.6. Quitosano.....	12
2.6.1. Propiedades químicas	13
2.6.1.1. Química y estructura.....	13
2.7. El uso de plastificantes y reticulantes en las películas biodegradables.....	14
2.7.1. Los agentes reticulantes se pueden distinguir en dos grandes grupos.....	16
2.7.1.1. Reticulantes homobifuncionales:	16
2.7.1.2. Reticulantes heterobifuncionales:	16
2.7.2. Glutaraldehído	17
2.7.3. Método Solvent Casting.....	17
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	18

3.1. Metodología en la Fabricación del bioplástico	19
3.1.1. Obtención de la queratina	20
3.1.1.1. Obtención de las plumas	21
3.1.1.2. Extracción primaria de queratina	21
3.1.1.3. Refinación de la queratina y eliminación del sulfuro residual ...	22
3.1.1.4. Determinación de grado de hidrólisis	23
3.1.2. Elaboración de películas biodegradables	24
3.1.2.1. Pruebas preliminares para la obtención de biopelículas	24
3.1.3. Diseño Experimental	26
3.1.3.1. Parámetros considerados en la experimentación	26
3.1.3.2. Variables dependientes e independientes	28
3.1.3.3. Diseño experimental de la elaboración de la biopelícula	28
3.1.4. Pruebas sensoriales	30
3.1.5. Ensayos para la determinación de las propiedades físico-mecánicas	31
3.1.5.1. Ensayo de tracción-deformación en un sentido:	31
3.1.5.2. Identificación de los tipos de plástico de acuerdo con los resultados de Esfuerzo- deformación	32
3.1.5.3. Ensayos de biodegradabilidad de las biopelículas por medio de compost	33
3.1.5.4. Ensayo de biodegradabilidad por medio de microorganismos	33
3.1.6. Análisis de resultados	35
4. CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS	35
4.1. Caracterización de la solución de queratina análisis de sulfuros	35
4.2. Análisis de grado de hidrólisis en Celdas Conway	36
4.3. Valorización sensorial de las películas biodegradables	36
4.4. Propiedades físico-mecánicas	38
4.4.1. Ensayo de Tracción	38
4.4.2. Factor de rotura	39
4.4.3. Fuerza de Tensión	40

4.4.4. Rotura de elongación.....	42
4.5. Biodegradación aeróbica en compostaje	44
4.6. Biodegradación por medio de microorganismos	46
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1. Conclusiones.....	52
5.2. Recomendaciones	53
REFERENCIAS	55
ANEXOS	64

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El uso de plásticos en la población mundial es indispensable para las actividades cotidianas, lo que ha generado efectos nocivos sobre el ambiente, dando paso a la contaminación ambiental a nivel mundial (Calle, López y Verduga, 2016), ya que las fundas plásticas al exponerse a la radiación solar, liberan al medio ambiente sustancias químicas como metano y etileno, considerados como potentes gases de efecto invernadero, principalmente cuando se acumulan en los centros de acopio de desechos y comienzan a descomponerse, por lo tanto estos componentes según el Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático, atrapa el calor calentando el planeta más de 80 veces más que el Dióxido de Carbono (Royer, Ferrón , Wilson y Karl, 2018)

Los residuos plásticos se acumulan en grandes cantidades y su degradación es lenta debido a sus características físicas y químicas. En un estudio reciente publicado en la revista "Science" se observó que hay partículas de plástico presentes en todos los cuerpos hídricos del mundo (De Almeida, Ruiz y Jimena, 2004). Sarah Jeanne Royer becaria postdoctoral en el Centro de Oceanografía Microbiana del SOEST, afirma que los plásticos entre mayores desfragmentaciones ocurran hasta convertirse en partículas como los microplásticos, aumenta el área disponible para la foto-degradación por lo tanto contribuyen a la producción de gases de efecto invernadero (Rodríguez, 2019). El reciclado de los plásticos aliviaría un poco la situación, pero sólo en parte. Por este motivo, la sustitución de los plásticos de fuentes de petróleo por biopolímeros totalmente degradables obtenidos a partir de fuentes de carbono renovables sería una solución mucho más completa para los diferentes problemas ambientales que se han presentado hasta la actualidad (ECOEMBES, 2008). Sin embargo, el alto precio de los bioplásticos en su parte productiva desincentiva a que inviertan las grandes empresas manufactureras, siendo un problema al tratar de que se puedan desplazar a los plásticos tradicionales.

Debido a esto, es necesario diseñar estrategias o alternativas viables para obtener plástico biodegradable a un costo similar (Barnes, Galgani, Thompson & Barlaz, 2009).

Los plásticos sintéticos tienen su origen en los derivados del petróleo, se estima que su degradación tarda alrededor de 500 años, permaneciendo como contaminantes durante largos períodos. Al respecto se han originado una formidable cantidad de investigaciones, con el objetivo de obtener polímeros biodegradables con propiedades idénticas a las de los plásticos convencionales, que puedan sustituir a estos últimos en aplicaciones semejantes (Castillo, Escobar y Fernández, 2015). Esta particularidad y la necesidad de su uso, hace indispensable investigar sobre la obtención de plásticos amigables con el ambiente, dando como resultado la creación de los biopolímeros (Calle, López, y Verduga, 2016).

El uso de los materiales bioplásticos se está extendiendo en varios sectores: en medicina (prótesis, hilos de sutura), en alimentación (productos de catering, envases de un solo uso), juguetes, e incluso en el mundo de la moda y, por supuesto en bolsas biodegradables. El bioplástico tiene su desafío en el desarrollo sostenible, por tanto, las grandes emisiones de dióxido de carbono durante la fabricación del plástico tradicional de origen pétreo se reducen con la producción de bioplásticos entre 0.8 y 3.2 toneladas en un periodo de un mes (Castillo, Escobar, y Gutiérrez, 2015).

En los últimos años, se han generado varias investigaciones de la fabricación de bioplástico en función de su origen (Pérez, Gómez, Díaz, Roncal, Cadierno y Torrecilla, 2007), por lo tanto, los que son procedentes de recursos renovables, es decir, los que se han extraído directamente a partir de biomasa, tales como proteínas, polisacáridos entre otros, como aquéllos cuyos biomonomeros son sintetizados para producir ácido poli-láctico, polímeros biodegradables basados en monómeros procedentes de la industria petroquímica y aparte producidos desde microorganismos como enzimas y bacterias (ECOEMBES, 2008).

Polímeros biodegradables ya a, encajan en el esclarecimiento de bioplásticos por tanto cumplen los criterios de la norma EN 1342 para biodegradabilidad y compostaje de plásticos y productos plásticos, también ya existen normas internacionales que establecen los requisitos técnicos que han de cumplir los bioplásticos y que están ayudando a su promoción en sectores tan importantes como el de envases y embalajes; como la norma EN 13432:2000 las cuales determina los requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación, además se encuentra la ASTM D-5488, creada con el objetivo de informar a los consumidores y usuarios acerca de los envases fabricados con plásticos biodegradables. Incluye especificaciones sobre la producción, uso y eliminación de los materiales y de los propios envases (Pérez, Gómez, Díaz, Roncal, Cadierno y Torrecilla, 2007).

La industria avícola no es la más contaminante comparada con otras industrias agropecuarias, pero su actividad de forma intensa genera grandes volúmenes de efluentes con altos niveles de contaminantes como, carga orgánica y microorganismos patógenos, siendo el residuo que genera mayor impacto negativo las plumas, las cuales afecta al componente agua (Lozada, y Alejandra, 2009)

La utilización de estos residuos agrícolas para hacer bioplásticos permite dar una segunda vida a un residuo y obtener un polímero biodegradable. De llegar a obtener resultados favorables, en un futuro se podría utilizar este desecho barato y abundante en la elaboración de varios productos, en lugar de que acabe incinerado o almacenado en los centros de acopio de basura (Calle, López & Verduga, 2016).

1.2. Objetivos

1.2.1.Objetivo General.

Elaborar bioplástico de queratina obtenida de residuos de plumas de aves de corral y quitosano

1.2.2. Objetivos específicos.

- Obtener queratina a partir de plumas de aves de corral, por medio de hidrólisis.
- Establecer las proporciones óptimas de mezcla para la obtención del biopolímero aplicable al mercado.
- Determinar el grado de biodegradabilidad de las biopelículas elaboradas.

1.3. Alcance:

El presente trabajo se realizó a nivel de laboratorio, donde se llevaron a cabo un proceso para la producción de la biopelícula, por medio de la hidrólisis se obtuvo la queratina producto de las plumas de aves de corral y quitosano comercial, con la adición de agentes plastificantes en diferentes concentraciones; estableciendo las proporciones óptimas de mezcla para la aplicación al mercado, mediante ensayos realizados en laboratorio se determinó el grado de biodegradabilidad de las biopelículas elaboradas y su caracterización físico mecánicas de las mismas.

1.4. Justificación:

La sociedad actual en sus diferentes actividades cotidianas mantiene el constante uso de material sintético, el cual una parte termina como desecho en los vertederos generando grandes cantidades anuales de desechos plásticos, y la otra fracción de plástico acaban en ríos, mares y suelos, provocando muerte de todos los organismos que consumen este material por equivocación (Thiel, Kroeger, Nuñez & Pantoja, 2013).

Estos residuos plásticos producto de industrias afectan a varios tipos de hábitats, incluso los considerados como más vírgenes o alejados de las fuentes de producción de estos materiales como las profundidades de los océanos (Rojo & Montoto, 2014), generado una amenaza a los macroinvertebrados, que representa una contrariedad a escala global por parte de los microplásticos, debido al pequeño tamaño, pueden ser ingeridas por invertebrados marinos y por lo tanto entrar fácilmente a la cadena alimenticia. Dado que la mayoría de los microplásticos que están en el mar se encuentra en los sedimentos, los organismos bentónicos, que viven asociados al fondo marino están fácilmente al acceso para la ingestión de los microplásticos (Thiel, Kroeger, Nuñez & Pantoja, 2013).

El plástico es netamente fabricado a partir del petróleo, y este al ser un recurso no renovable, en un futuro muy cercano se va agotar recurriendo a métodos de extracción de mayor impacto ambiental, con emisiones altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (Enshassi, Kochendoerfer & Rizq, 2014), Para prevenir, solucionar, evitar el agotamiento de recursos no renovables e impactos negativos, se están realizando estudios para la búsqueda de materiales alternativos, que sean amigables con el ambiente, como bioplásticos.

Hoy en día los plásticos han llegado a tener un fuerte desarrollo investigativo en la producción de diferentes materiales, con facilidad en el proceso de plastificación para la elaboración de diferentes matrices poliméricas ya que estos se encuentran en abundancia en la naturaleza de fuentes renovables como son, lípidos, polisacáridos y proteínas, dándose la ventaja de degradarse con mayor facilidad (Villada, Acosta y Velasco, 2008).

La presente investigación plantea una propuesta para el aprovechamiento de los desechos generados por las faenadoras de pollos y así evitar la acumulación y contaminación por su inadecuada disposición final; por otro lado, en generar un plástico biodegradable con buenas características físico-mecánicas a base de queratina, una proteína que se encuentra en las plumas de aves (Mohanty, Misra, Manjusri, Drzal, 2005) y quitosano el cual tiene con la capacidad de

formar películas y con propiedades antimicrobianas. Las películas que contienen quitosano han mostrado ser prometedoras para su aplicación en la preservación de alimentos por poseer propiedades, como es la capacidad de formar películas, las propiedades de barrera de gas y aroma en condiciones secas, de tal forma que se convierte en un material apropiado para el recubrimientos y estructuras de empaque de alimentos (Villada, Acosta y Velasco, 2008).

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Polímeros

Los polímeros también son comúnmente llamados plásticos, el término polímero, según sus raíces, quiere decir *poly*= muchos *meros*= partes, es decir está constituido por muchas partes que forman una cadena de varias moléculas que contiene una gran cantidad de átomos, por lo que presentan alto peso molecular. Elementalmente está conformado principalmente por carbono, hidrogeno, oxigeno, azufre y nitrógeno (Vargas, Ríos, y Contreras, 2018).

2.2. Biopolímeros

Los polímeros biodegradables son polímeros en los cuales la degradación resulta de la acción de microorganismos naturales como bacterias, hongos y algas y se pueden consumir en semanas o meses en condiciones favorables de biodegradación. Se pueden producir de fuentes naturales renovables como el maíz, la celulosa, las papas, la caña de azúcar, o incluso derivados de fuentes animales como quitina, quitosano o proteínas. Se pueden obtener otros polímeros biodegradables de fuentes fósiles, petróleo o de la mezcla entre biomasa y petróleo. Los polímeros biodegradables más conocidos del petróleo son las policaprolactonas: PCL, poliesteramidas, copoliésteres alifáticos y copoliésteres aromáticos (Brito.y Mélo, 2011).

Por otra parte, la norma europea EN 13432:2000 establece que un plástico es considerado como biodegradable si su descomposición por microorganismos en medio aerobio, con presencia de oxígeno, da como resultado dióxido de carbono, agua, sales minerales y una nueva biomasa, o bien si dicho proceso es anaerobio, en ausencia de oxígeno, da como resultado dióxido de carbono, metano, sales minerales y biomasa.

Es importante señalar que el grado de biodegradabilidad de los plásticos depende de la temperatura del medio, la humedad, la presencia o no de oxígeno y de la composición de la flora microbiana (Jiménez y Ariosti, 2008).

Entre los polímeros biodegradables, los que han llamado más la atención son los obtenidos de fuentes renovables, debido al menor impacto ambiental causado por su origen, el balance positivo de dióxido de carbono (CO₂) después del compostaje y la posibilidad de formación de un ciclo de vida cerrado, como se ilustra en la *Figura 1*.

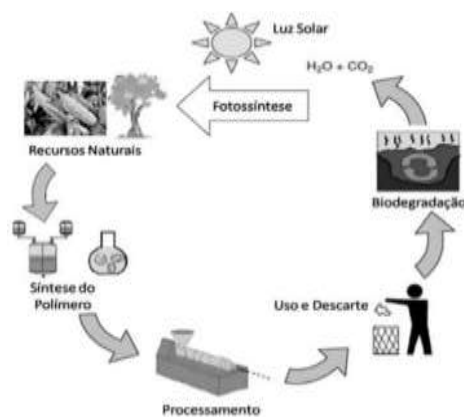


Figura 1 Ciclo de vida de los biopolímeros provenientes de fuentes renovables. Tomado de (Gupta, 2014).

2.3.Fuentes de producción de los biopolímeros

Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes que son:

- Origen Animal: El colágeno, la queratina, triglicéridos

- Origen Marino: La quitina y el quitosano.
- Origen Agrícola: Las proteínas y polisacáridos.
- Origen Microbiano: El ácido poliláctico (PLA) y los polihidroxicanoatos

2.4. Clases de biopolímeros

2.4.1. Polímeros biodegradables naturales

Polímeros obtenidos de fuentes naturales

Son polímeros que se encuentran disponibles en la naturaleza y que pueden ser extraídos de plantas y animales, por ejemplo, el almidón, la celulosa, proteínas como la caseína y el gluten, entre otros. La celulosa se encuentra en abundancia en la naturaleza, es de carácter hidrofílico y su procesamiento es relativamente complicado debido a su baja solubilidad, sin embargo, existen productos derivados de ésta tales como el celofán o el acetato de celulosa con aplicaciones en diferentes áreas. Un ejemplo de polímero natural de fuente animal es la quitina que se encuentra en el caparazón de los crustáceos y otros invertebrados, de la cual se deriva el quitosano, empleado como espesante, clarificante y agente antimicrobiano (Dávila., Galeas y Valdivieso, 2011).

Polímeros obtenidos por síntesis química

Estos polímeros se obtienen mediante la síntesis clásica de monómeros biológicos renovables. Un ejemplo es el ácido poliláctico (PLA), que es un biopoliéster sintetizado a partir de monómeros de ácido láctico, obtenido a partir de recursos renovables como el maíz, la remolacha azucarera, el trigo, entre otros. El procedimiento de síntesis química consiste en extraer el almidón de la materia prima con el fin de obtener dextrosa, la cual es procesada vía fermentación para convertirla en ácido láctico (ECOEMBES, 2008).

Polímeros obtenidos de microorganismos modificados genéticamente

Son plásticos obtenidos como producto de la metabolización de microorganismos. Son producidos por bacterias que desarrollan gránulos del

polímero dentro de la célula misma. La bacteria se desarrolla y reproduce en un cultivo, y el material plástico luego se separa y purifica (ECOEMBES, 2008).

2.4.2. Polímeros biodegradables sintéticos

Los polímeros provenientes del petróleo son materiales no biodegradables. Sin embargo, se pueden introducir ciertos grupos moleculares a su estructura, tales como almidones, que los hacen susceptibles de degradarse por acción de ciertos microorganismos (Sosa, 2011).

Otros polímeros sintéticos biodegradables son (ECOEMBES, 2008):

- Almidón + PET modificado
- Almidón + PCL (policaprolactona)
- Almidón + PBS (polibutileno succinato) / PBSA (polibutileno succinato adipato)
- Almidón + PVOH (polivinil alcohol)
- PLA (ácido poliláctico) + PHA (polihidroxi alcanoato)

2.5. Queratina

La queratina es una proteína estructural fibrosa compuesta por gran variedad de aminoácidos, encontrándose en mayor abundancia la Glicina, Cistina, y Cisteína (Salazar, 2013). Existen dos tipos de queratina diferenciadas por sus componentes y estructura: α y β queratina. La α queratina se caracteriza por tener en su estructura puentes disulfuro que otorgan una gran resistencia, estando presente en materiales como la lana de oveja, el pelo, las uñas y la piel (Gallardo y Valladolid, 2015). También se encuentra α queratina en las fibras de tejidos duros de proteína tales como los cuernos, cascos, lana entre otros (Paniagua, Ossa y Ruiz 2008).

La β queratina se diferencia principalmente en el rango de elongación de la cadena de los aminoácidos y la poca concentración de cisteína, por lo tanto, contiene pocos entrecruzamientos a través de puentes de disulfuro, dando lugar

a filamentos suaves y flexibles, presentándose en mayor porcentaje en las telas de araña, plumas de aves, escamas reptilianas, entre otros (Espinel, 1992, pp. 9).

En general, las proteínas son polímeros capaces de promover enlaces intra e intermoleculares, permitiendo que los materiales resultantes tengan una gran variación en sus propiedades funcionales. La queratina nativa es insoluble en agua y en solventes orgánicos, pero pese a su alta estabilidad química mediante tratamientos esta puede ser digerida mediante técnicas químicas o enzimáticas (Ortega, 2017).

2.5.1. Fuentes de la queratina: estructura de las plumas

La industrialización de aves de corral genera grandes volúmenes de residuos, entre estos las plumas de difícil degradación y cuya disposición final representa un problema ambiental. Solo una pequeña proporción se destina para la alimentación animal, siendo un proceso costoso, ya que las plumas se deben esterilizar a elevada temperatura y alta presión, luego secarlas y molerlas. El producto obtenido es de baja calidad proteica, con déficit de algunos aminoácidos esenciales y de baja digestibilidad para los animales. Otros métodos como el quemado o enterrado son usados para su disposición final, pero estos son poco amigables con el ambiente. La quema de plumas genera gases que contaminan el aire y para su disposición en rellenos se requiere grandes lotes de tierra siendo su descomposición muy lenta (Fan, 2008).

Las plumas corresponden al 57% del peso del pollo (Schrooyen, 2007), está conformada por una parte central conocida como raquis, que le sirve de eje y otorga la rigidez necesaria para mantenerla firme; la parte inferior más ancha y rígida por la cual la pluma se une a la piel se denomina Calamus y las barbas son láminas delgadas en posición perpendicular al raquis (figura 2). Las plumas están compuestas en un 90% de proteína conocida como queratina.

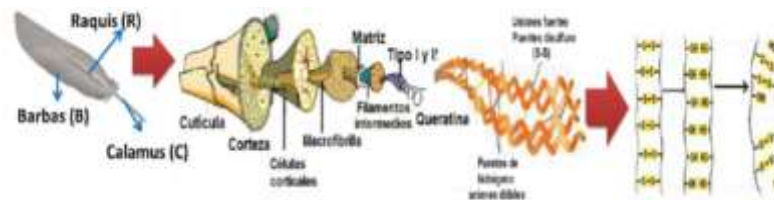


Figura 2. Esquema de la estructura de la queratina.

Tomado de (Orjuela Palacio y Zaritzky, 2015).

2.5.2. Métodos de obtención de la queratina

La hidrólisis de esta proteína puede liberar aminoácidos hidrosolubles con lo cual puede resultar en un líquido cremoso con aplicaciones industriales. La posibilidad de hidrolizar esta sustancia podría ayudar en la consecución de un producto útil para productos donde se requiera gran cantidad y variedad de aminoácidos, brindando una alternativa de uso a esta dura y fibrosa estructura de los tejidos.

Existe una gran cantidad de técnicas relacionadas con queratinas, hidrolizados de queratina y productos derivados de queratinas, así como con la preparación y usos de estos (Kowalsk, 2011). Especialmente las industrias cosmética y textil están interesadas en productos derivados de queratina para peinar y modificar el cabello y la lana. Los shampoos y el esmalte de uñas con queratina hidrolizada, son solo ejemplos de formulaciones de la técnica anterior que utilizan queratinas. Aunque estas aplicaciones son numerosas, son básicamente formulaciones de productos que utilizan principalmente queratina hidrolizada como uno de los componentes. Dichos productos tienen un bajo valor agregado y son de uso limitado.

La técnica en la que las queratinas se usan como polímero en películas o recubrimientos es mucho menos abundante, como lo demuestra una revisión de esta técnica en la tesis de uno de los inventores. Generalmente, de acuerdo con los procesos descritos en estas referencias, las queratinas insolubles se extraen de su fuente natural y se solubilizan, por ejemplo, en un medio acuoso. En dicha

extracción / solubilización implica al menos la interrupción de los enlaces disulfuro, que rompe las microfibrillas para proporcionar las moléculas de queratina separadas (Sosa, 2011). Dependiendo de las condiciones utilizadas, la extracción, solubilización también puede implicar hidrólisis o degradación de las propias moléculas de queratina, es decir, escisión de los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que forman las moléculas de queratina.

2.5.3. Usos de la queratina

En la actualidad, el interés por el desarrollo de productos ambientalmente sostenibles, generados a partir de proteínas de desechos se está incrementando. (Schrooyen y Oberthur, 2007). Las aplicaciones de los productos derivados de la queratina a nivel cosmético y farmacéutico son muy amplias; también han surgido otros usos como componente de varias clases de productos y en tejidos biodegradables. Las características de este tipo de proteína la hacen apropiada para la manufactura de fibras para usos textiles con aplicaciones médicas y sanitarias. (Kowalski, Krausmann, Giljum, y Lutter, 2011).

2.6. Quitosano

El quitosano es un polímero de cadena lineal, es decir de unidades de la D-glucosamina y la N-cetil-D-glucosamina, por lo que es poco frecuente en la naturaleza; es obtenido químicamente a escala industrial mediante el proceso de desacetilación extensiva de la quitina aislada de los exoesqueletos de los crustáceos, moluscos y también de las paredes celulares de muchos tipos de hongos (Ruíz y Guerrero, 2009).

La quitina, después de la celulosa, se encuentra como el segundo biopolímero de mayor abundancia en nuestro planeta, constituyendo un recurso renovable importante (Hernández, et., al 2008). La quitina es de difícil disolución y, a pesar de que actualmente existen sistemas disolventes, a lo largo de los años se han desarrollado derivados de mayor solubilidad como el quitosano. (Giraldo, 2015).

El quitosano al ser conocido como un polímero biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad, en los últimos diez años ha sido utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos, y comercialmente en la manufactura de parches cicatrizantes (Mejía, Martínez, y Lara, 2018), además de que se lo utiliza en la industria de alimentos como aditivo. El quitosano también se comercializa en Europa, EUA y en otros países como un captador de grasa en formulaciones para reducir el colesterol y el sobrepeso, se ha evaluado en ensayos clínicos como potenciador del ingreso al organismo de fármacos utilizados por vía nasal. (Illum, Jabbal-Gill, Hinchcliffe, Fisher, y Davis, 2001).

2.6.1. Propiedades químicas

2.6.1.1. Química y estructura

El quitosano tiene un contenido de nitrógeno (N) mayor al 7 % (Muzzarelli, 1993) y con una distribución regular de los grupos amino libres, que pueden ser protonados por ciertos ácidos, cargándose positivamente, lo que le confiere un comportamiento de polielectrolito (Glasser, 1997).

Este hecho permite explicar algunas propiedades del quitosano como son: la habilidad de enlazarse con sustancias cargadas negativamente tales como lípidos, proteínas, colorantes, entre otras; así como su comportamiento como floculante, adherente y adsorbente, adicionales a las reacciones típicas de las aminas (Rodríguez, Ramírez, Rivero, Bosquez, Barrera & Bautista, 2009).

Una propiedad importante del quitosano es su estructura rígida, caracterizada por numerosos enlaces puentes hidrógeno, la cual le confiere una buena estabilidad térmica. De acuerdo con Sugimoto (1999), se descompone aproximadamente a 170 °C y se degrada antes de fundir, lo cual es característico de polisacáridos que poseen muchos enlaces por puentes de hidrógeno.

En cuanto al grado de acetilación, se ha establecido que la quitina con más de un 50 % de desacetilación debe ser considerada quitosano e incluso algunos investigadores la definen como tal con un grado de desacetilación superior al 60 %. Usualmente el grado de desacetilación se encuentra comprendido entre 60-98% con el quitosano (Harish y Tharanathan, 2007).

Las diversas funciones del quitosano están relacionadas con la presencia de los grupos amino libres en cada residuo monomérico de su molécula. Estas funciones se atribuyen a las tres formas estructurales en que se puede encontrar la molécula: la forma cristalina hidratada, la cristalina no hidratada y la no cristalina o amorfa. Ogawa y Yui (1993), encontraron que muestras de quitosano ricas en cristales anhidros, no se disuelven con facilidad en disolventes tales como ácido acético en solución acuosa; asimismo, reportan que los estudios de difracción de rayos x muestran que en el quitosano totalmente desacetilado prevalece la presencia de formas polimórficas hidratadas. A medida que disminuye la desacetilación aparecen en el patrón de rayos x las señales débiles que sugieren la presencia de pequeñas cantidades remanentes de alfa quitina y la aparición de cristales de quitosano no hidratados (Hernández, 2013).

2.7.El uso de plastificantes y reticulantes en las películas biodegradables

Los plastificantes son sustancias normalmente líquidas y de viscosidad mayor a la del agua, que se adicionan a la mezcla, por lo que juegan un papel crucial en la microestructura y cristalización del material elaborado, observándose diferencias en su aspecto físico y sus propiedades mecánicas finales, por lo tanto, mejorando la flexibilidad del material mediante la reducción de las fuerzas intermoleculares. La proporción de plastificante añadido influye por ser el causante de la desestructuración de las cadenas del material, repercutiendo tanto en sus propiedades morfológicas y mecánicas, así como en sus propiedades térmicas de transición vítrea. Las formulaciones varían entre el 50-90% en peso del producto y entre el 10-40% en peso de aditivos plastificantes, sin embargo, si el plastificante se encuentra presente en cantidades muy

pequeñas normalmente se comporta como anti plastificante, es decir aumentan la dureza y disminuyen el alargamiento de los polímeros, (Enríquez, Velasco y Fernández, 2013).

El efecto plastificante puede ser dado por sustancias como: agua, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, aminas, ésteres, amidas y mezclas entre estos, pero se prefiere utilizar plastificantes cuya presión de vapor sea baja para evitar que éste se volatilice al finalizar el proceso de extrusión o de calentamiento (Andersen, Ong, Christensen y Hodson, 2001). La adición de plastificantes disminuye la temperatura de fusión y la temperatura de transición vítrea, cambiando su comportamiento reológico debido a que logra movilizar moléculas, dando plasticidad al material (Chaleat, Halley y Truss, 2008).

Los plastificantes de uso más común es la glicerina, según Otey (1982), los plastificantes solubles en agua como el glicerol son efectivos agentes suavizantes, mejorando la flexibilidad de las películas resultantes. Cuanto más se incluye una sustancia plastificante en una matriz polimérica, la elongación y la deformación se incrementan mientras que el esfuerzo de ruptura. (Enríquez, Velasco, y Fernandez, 2013). La glicerina es un polialcohol primario, es viscoso, incoloro, inodoro, higroscópico, es decir absorbe agua del aire; se derrite a 17,8 °C, su punto de ebullición con descomposición es a 290 °C, y es miscible con agua y etanol. Los términos glicerina o glicerol son utilizados indistintamente para referirse al compuesto mismo, por lo que presenta condiciones apropiadas de agente plastificante, pues permitirá que el polímero forme película, además no presenta riesgo de toxicidad ni restricciones para la adquisición del producto. El glicerol es un alcohol con tres grupos hidroxilo como se puede observar a continuación.

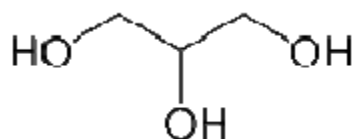


Figura 3. Estructura molecular del glicerol.

Tomado de (Posada y Cardona ,2010)

Por otro lado, los agentes reticulantes, pueden ser naturales o sintéticos, entre ellos se encuentran, por ejemplo, glutaraldehído, formaldehído, compuestos epoxi, ácidos carboxílicos o genipina. Generalmente, los agentes reticulantes pueden ser los di- o triácidos carboxílicos o la genipina, por ser biocompatibles. La reticulación se fundamenta preferiblemente en la reacción de los grupos amino del polímero con los agentes reticulantes, formándose preferentemente grupos amida que entrelazan cadenas del polímero bajo condiciones experimentales suaves formando una especie de red (Herranz y Gómez, 2016). En otra realización preferida del procedimiento de la invención, la relación agente reticulante/polímero (peso/peso) se encuentra entre 0,0005 y 5. Más preferiblemente, dicha relación varía entre 0,05 y 2,5.

2.7.1. Los agentes reticulantes se pueden distinguir en dos grandes grupos:

2.7.1.1. Reticulantes homobifuncionales:

Tienen grupos reactivos idénticos en cada uno de sus extremos. En general, deben ser utilizados en procedimientos de reacción de un solo paso para fijar o polimerizar al azar las moléculas que contienen como grupo funcional. Esto es útil para la captura de una instantánea de todas las interacciones de proteínas, pero no puede proporcionar la precisión necesaria para otros tipos de aplicaciones de reticulación.

2.7.1.2. Reticulantes heterobifuncionales:

Poseen diferentes grupos reactivos en cada extremo. Estos reactivos no sólo admiten una sola fase de conjugación de moléculas que tienen el grupo funcional de destino respectivo, sino que también permiten para secuenciales (dos marchas) conjugaciones que minimicen la polimerización indeseable o la auto conjugación. En los procedimientos secuenciales, los reactivos

heterobifuncional reaccionan con una proteína manejando primero el grupo más poco estable del agente de reticulación. Después de eliminar el exceso de agente de reticulación que no ha reaccionado, se añade la primera proteína modificada a una solución que contiene la segunda proteína y se produce la reacción a través del segundo grupo reactivo del agente de reticulación. Ejemplos de agentes heterofuncionales se encuentra el glutaraldehído, formaldehído y la transglutaminasa (Contreras y Bravo, 2018).

2.7.2. Glutaraldehído

El glutaraldehído es un compuesto químico de la familia de los aldehídos, conocido también como 1,2 diformilpropano, es un líquido dialdehído alifático de bajo peso molecular, incoloro y de olor picante, es soluble en agua y en solventes orgánicos como el etanol, el benceno y el éter, en agua es ligeramente ácido, emana olores tóxicos.

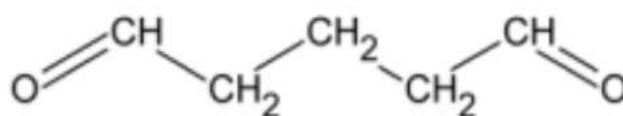


Figura 4. Esquema de la estructura química del glutaraldehído.

Tomado de (Herranz Gómez, G. 2016).

Es un potente bactericida y se usa como desinfectante en frío de equipo médico y científico que es sensible al calor, incluyendo los instrumentos de diálisis y de cirugía. En la industria del cuero se usa como agente curtidor y es un componente de líquidos de embalsamamiento, gracias a estas características tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular, por lo que es el fijador de referencia para observación de ultraestructuras celulares con el microscopio electrónico, se utiliza para elaborar biocidas.

2.7.3. Método Solvent Casting

La fundición con solvente es el método preferido utilizado para formar películas de proteínas. Hay varios tipos de equipos disponibles para la fundición de películas con solvente, desde simples placas de fundición hasta recubrimientos de laboratorio continuos y por lotes más avanzados. Debido a que es eficaz y rentable, el método más utilizado para formar muestras de película proteica para investigación es mediante la distribución manual de soluciones de película diluida (generalmente 5–10% de sólidos) de proteína y plastificante en placas de Petri niveladas y luego secarlas en condiciones ambientales o humedad relativa controlada, (Dangaran, Tomasula, y Qi, 2009).

Kozempel y Tomasula (2004) desarrollaron un proceso continuo para la fundición con solvente de películas de proteínas. Los parámetros que deben determinarse para la producción continua de película son la temperatura del aire, las propiedades de la superficie del sustrato sobre el cual se forman las películas, la velocidad de flujo y el tiempo de secado. Las películas se pueden secar en condiciones ambientales, con aire caliente, energía infrarroja o energía de microondas. El método de secado puede afectar significativamente las propiedades físicas de la película final, incluida la morfología, apariencia y propiedades de barrera y mecánicas de la película (Perez y Krochta 2000).

3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

El actual trabajo de investigación fue de tipo experimental, se realizó en el laboratorio de aguas de la Carrera de I A., Consistió en realizar películas biodegradables utilizando queratina y quitosano. Además, tuvo como finalidad implementar una alternativa para la reducción de residuos avícolas por medio de la producción de un polímero biodegradable. Se basó en actividades de laboratorio en sus tres fases: obtención de la materia prima, prueba de mezclas para la elaboración de biopelículas y análisis de biodegradabilidad del material generado. El primero consta de la obtención de la materia prima, que es la queratina a partir de plumas, obtenidas de la industria avícola, la cual se

complementó con quitosano comercial; el segundo proceso consta de la obtención propiamente de las películas biodegradables utilizando varias mezclas de acuerdo al diseño experimental propuesto, mediante el método "solvent casting" con glicerina como agente plastificante y como agente reticulante, glutaraldehído, para así proceder a una evaluación de las películas biodegradables.

3.1. Metodología en la Fabricación del bioplástico

DIAGRAMA DE PROCESO DE LA FABRICACIÓN DE LA BIOPELÍCULA

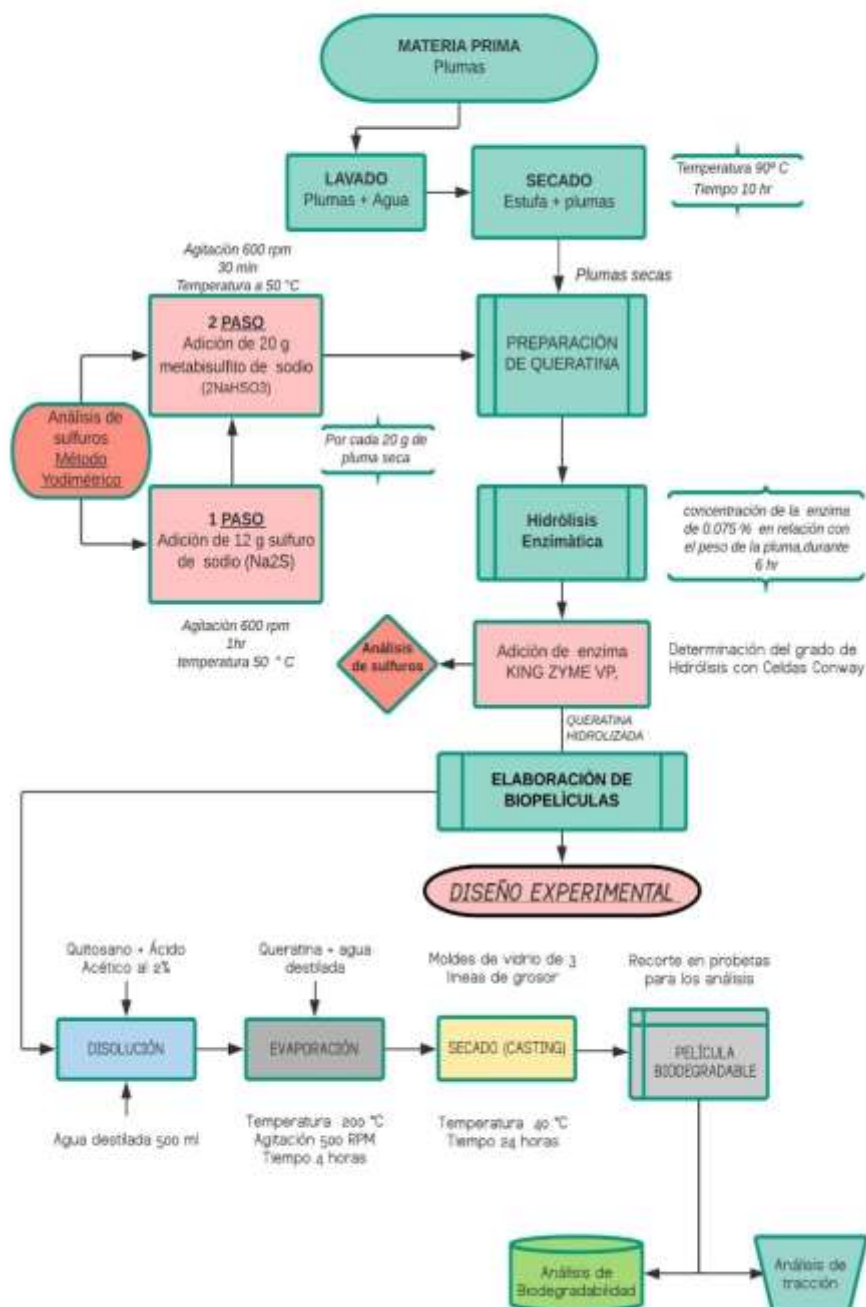


Figura 5. Diagrama de flujo del proceso de obtención de las biopelículas

3.1.1. Obtención de la queratina

3.1.1.1. Obtención de las plumas

La materia prima que se obtuvo fue de 1 kilo aproximado producto de los desechos de un local ubicado en el sector Vista Hermosa, en la avenida de los Nogales y de los Olivos, en el cual realizan el faenamiento para la venta de pollo al por menor, donde su principal desecho son las plumas, producto del desplume de las aves, con un promedio aproximado de 3 kg de plumas por semana. Lavado y secado de las plumas

Lavado

Las plumas se lavaron en un recipiente de plástico con agua y detergente, manteniendo una agitación manual, se repitió el proceso hasta eliminar por completo cualquier exceso de materia orgánica, es decir que no se presente mal olor o restos de sangre y de vísceras, para así garantizar su conservación.

Secado

Las plumas lavadas fueron secadas en una estufa marca WiseVen, Fuzzy Control System, a 90° C durante 24 horas, de esta forma el material quedó con niveles muy bajos de humedad ($\pm 15\%$) (Florida,2007); posteriormente fueron almacenadas herméticamente en funda plástica.



Figura 6. Plumas tratadas

3.1.1.2. Extracción primaria de queratina

Se utilizaron los tratamientos, el primero con sulfuro de sodio y posteriormente con metabisulfito de sodio, aplicados a 20 gramos de plumas secas.

El proceso se puso en marcha con la adición de 12 gramos de sulfuro de sodio (Na_2S) en 500 ml de agua, se agitó manualmente y se mantuvo a una temperatura de 40°C con una chaqueta de calentamiento durante una hora, se dejó la mezcla en reposo por 24 horas para completar su reacción, luego de lo cual se realizó una agitación final de 30 minutos más. Posteriormente se añadieron 20 gramos de metabisulfito de sodio (NaHSO_3) y se agitó de forma manual durante 30 minutos y así alcanzar un pH óptimo de 7 para activar la enzima que se utilizó en la hidrólisis y, además, para eliminar el sulfuro residual (Valencia, 2018). Finalmente, para determinar los sulfuros residuales de la mezcla se realizó el análisis Yodimétrico bajo el método Normalizado APHA-AWWA-WPCF (Anexo 1 y 2).

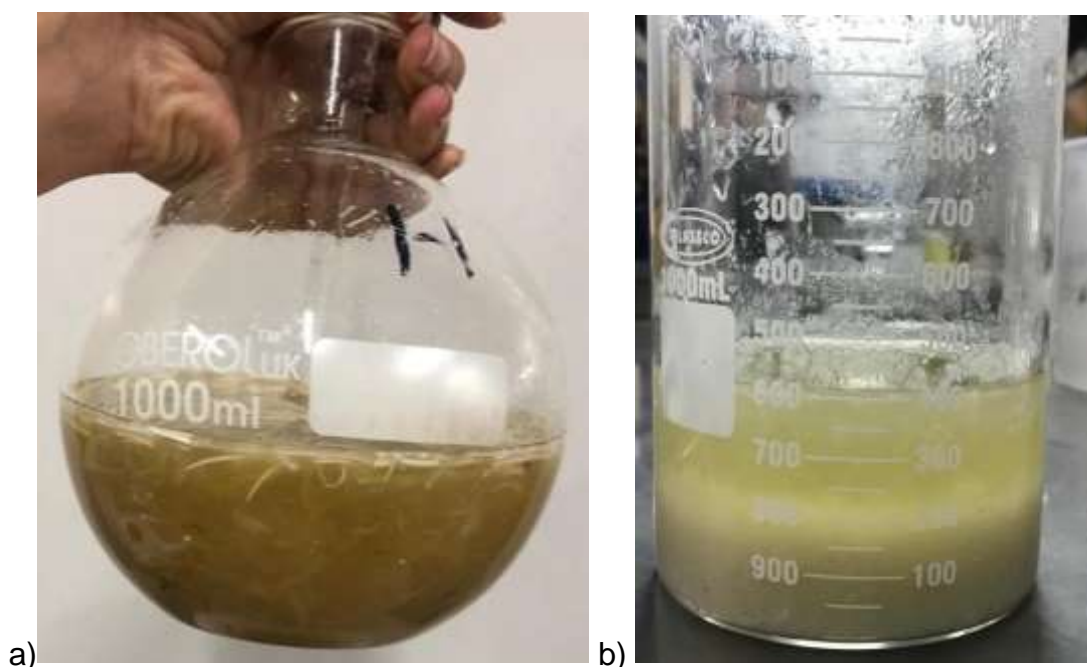


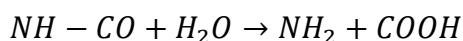
Figura 7. a) Tratamiento con sulfuro de sodio y b) metabisulfito de sodio de las plumas

3.1.1.3. Refinación de la queratina y eliminación del sulfuro residual

Se realizó mediante una hidrólisis alcalina enzimática, con la enzima KYGZYME VP (Anexo 6), en una concentración de base 0.1 M y un porcentaje de 0.075 % sobre la mezcla previamente obtenida. Para la activación enzimática el pH fue de 7; con un tiempo de reacción de 6 horas; se mantuvo a una temperatura de 40° C y con una agitación constante de 300 rpm (Valencia, 2018).

3.1.1.4. Determinación de grado de hidrólisis

La determinación del grado de hidrólisis se realizó mediante la micro difusión de grupos amino libres con celdas Conway, basado en la reacción que se produce durante la hidrolisis se determinó el cálculo de los aminos libres (NH₂.) La reacción se presenta a continuación.



Para el análisis se realizó la preparación de los siguientes reactivos: indicador mixto, Ácido Bórico, solución concentrada de Hidróxido de Potasio y solución de Ácido Clorhídrico al 0.01 N (Anexo 3). El proceso consistió en añadir 1 ml de ácido Bórico con el indicador mixto en la casilla interior de la celda, posteriormente se le añadió 0.5 ml de la muestra de queratina obtenida y 1 ml de KOH en la casilla exterior, se procedió a cerrar la celda de Conway, se le agitó ligeramente, para finalmente dejar reposar durante dos horas, terminado el proceso de reposo, se procedió a titular con HCL al 0.01 N.



Figura 8. Reacción de micro difusión de aminos libres en celdas Conway

Para la obtención del material hidrolizado, se procedió a la resolución del siguiente cálculo, considerando que:

$$1 \text{ ml de HCL } 0.01 \text{ N} = \frac{0.16009 \text{ mg NH}_2 \text{libres}}{1 \text{ ml de HCL } 0.01 \text{ N}}$$

A partir de este cálculo, se conoció el valor de aminos libres y se lo transformó en porcentaje. Posteriormente se calculó el grado de hidrólisis mediante la concentración de aminos libres y sobre la evaluación de aminos libres que se pueden liberar de la proteína, el cual se muestra a continuación (Anexo 4 y 5):

°H= Grado de Hidrólisis

C= Concentración de aminos libres

$$^{\circ}H = \frac{C \left(\frac{\text{gr NH}_2 \text{libres}}{\text{gr pluma seca}} \right)}{0.137929 \frac{\text{gr NH}_2 \text{totales}}{\text{gr pluma seca}}} * 100$$

3.1.2. Elaboración de películas biodegradables

3.1.2.1. Pruebas preliminares para la obtención de biopelículas

a) Selección de porcentajes de queratina

Se realizaron pruebas preliminares para la obtención de las concentraciones de quitosano, queratina y sus agentes plastificantes y reticulantes en un volumen determinado.

Inicialmente se realizaron varias disoluciones del quitosano con ácido acético al 2% más agua destilada y queratina con agua, para poder determinar la concentración máxima que se podría solubilizar con el quitosano. La determinación se la hizo visualmente, observándose la dificultad para disolverse de acuerdo con la formación de “grumos”. De esta manera se determinó que se puede preparar una solución máxima de queratina en quitosano del 50 %, ya que su exceso forma “grumos” de difícil disolución y no se obtenía una biopelícula uniforme.

b) Selección de porcentajes de glicerina y glutaraldehído

Se realizaron varias pruebas con adición del agente plastificante, establecido en precedentes investigaciones en las que las formulaciones varían de un 10-40% en peso de aditivos. Se determinó que las cantidades adecuadas para las soluciones de queratina y quitosano están entre un 10 % y 20%, ya que al adicionar valores por fuera de este rango las biopelículas no se formaban adecuadamente tornándose pegajosas o quebradizas. Además, la adición del agente reticulante no aportó ningún valor significativo en las biopelículas, ya que incrementaba la cristalización de la película tornándose quebradiza e impidiendo la formación de films, razón por la cual se desechó el uso del glutaraldehído para los posteriores ensayos.

c) Tipo de molde para la elaboración de las biopelículas

Se utilizaron moldes de vidrio prefabricados para un desmoldado sencillo. Se construyó de un tamaño de 12X25 cm y 3 mm de altura, que proporcionaban el tamaño y grosor requerido de las películas para posteriores ensayos y análisis con las mismas.



Figura 9. Moldes para las biopelículas

3.1.3. Diseño Experimental

3.1.3.1. Parámetros considerados en la experimentación

Porcentaje de disolución del quitosano: Se preparó una solución de quitosano al 4% disolviéndolo en una solución acuosa de ácido acético al 2% (v/v).

Volumen de la solución total: El volumen para trabajar en la elaboración de las películas biodegradables se definió para cada muestra en 500 ml, para así lograr la adecuada disolución del quitosano con la queratina.

Temperatura de evaporación de la mezcla: se determinó en 250 °C de temperatura de la mezcla, con agitación constante para agilizar el proceso de evaporación de la muestra, con un volumen final de 250 ml de cada muestra, aportando una película más homogénea en un agitador magnético de la marca WiseStir SMHS Systematic Multi-Hotplate Stirrers, 3 places, Ceramic-coated Plates.

Tiempo de mezclado: Se determinó 3 horas de mezclado en un agitador magnético de la marca WiseStir SMHS Systematic Multi-Hotplate Stirrers, 3 places, Ceramic-coated Plates.

Temperatura de secado: se determinó 40°C de secado en una estufa de laboratorio de la marca WiseVen, Fuzzy Control System.

Tiempo de secado: un tiempo estimado de secado de 24 horas en una estufa de laboratorio WiseVen, Fuzzy Control System.

Espesor de las biopelículas: todas muestras se encuentran en un espesor menor a 1 mm.

Se determinaron los valores del diseño experimental basándose en la pureza de los diversos productos utilizados, como base para el cálculo de los porcentajes se determinó el total de la solución A + B adicionando las varias concentraciones de glicerina en relación con el peso de la solución total. Para la determinación del volumen de queratina requerido para las diversas concentraciones se conoce que por cada corrida del proceso de las plumas se obtuvo 500 ml de solución, se encuentra 18 g de queratina pura, entonces se realizó una simple regla de tres para encontrar los volúmenes respectivos.

Tabla 1.

Determinación del volumen de queratina

Niveles	Queratina 90%			Queratina 100% (ml)
	90%	Solución de queratina (ml)	Cantidad de queratina (g)	
50%	2.5	500	18	69.444
70%	1.5	500	18	41.7
30%	0.5	500	18	13.9
100%	5	500	18	138.9
0%	0	500	18	0

Se determinó un proceso similar para obtener a partir de un 99.5 % al 100% de pureza de glicerina en peso, con regla de tres.

Tabla 2.

Determinación del peso de la glicerina

Niveles	Glicerina 99.5 %	Glicerina 100 %
10	0.555	0.56
15	0.882	0.89
17	1.024	1.03

3.1.3.2. Variables dependientes e independientes

Tabla.3

Variables dependientes e independientes

	Variables Independientes	Variables dependientes
Elaboración de biopelículas	-Concentración de quitosano -Concentración de queratina -Porcentaje de agente plastificante (glicerina)	Propiedades físico-mecánicas -Fuerza de tracción según la Norma ASTM D882 Propiedades biodegradables -Biodegradabilidad

Nota: Adaptado de Nuevos materiales: aplicaciones estructurales e industriales. (Dávila, J. L., Galeas, S., Guerrero, V. H., Pontón, P., Rosas, N. M., Sotomayor, V. & Valdivieso, C., 2011).

3.1.3.3. Diseño experimental de la elaboración de la biopelícula

Tabla 4.

Diseño experimental de la preparación de la biopelícula

Mezcla de queratina 90% g			Mezcla de quitosano 100% g		Total, de la solución A+B	Agente plastificante (glicerina 99,5%) g		Tratamientos	Repeticiones
A1	ml	50%	B1	50%	5	10%	0.558	(A1B1C1)	10
	62.5	2.5		2.5		15%	0.887	(A1B1C2)	10
						17%	1.029	(A1B1C3)	10
A2	ml	30%	B2	70%		10%	0.558	(A2B2C1)	12
	37.5	1.5		3.5		15%	0.887	(A2B2C2)	12
						17%	1.029	(A2B2C3)	12
A3	ml	10%	B3	90%		10%	0.558	(A3B3C1)	12
	12.5	0.5		4.5		15%	0.887	(A3B3C2)	12
						17%	1.029	(A3B3C3)	12
A4	ml	100%	B4	0%		10%	0.558	(A4B4C1)	12
	125	5		0		15%	0.887	(A4B4C2)	12
						17%	1.029	(A4B4C3)	12
A5	ml	0%	B5	100%		10%	0.558	(A5B5C1)	12
	0	0		5		15%	0.887	(A5B5C2)	12
						17%	1.029	(A5B5C3)	12
TOTAL, DE MUESTRAS								15	180
TOTAL DE PROBETAS									

Se utilizaron 3 factores con diversos niveles, donde el primer factor (A) corresponde a la concentración queratina, el segundo factor (B) corresponde a la concentración de quitosano, con 5 niveles y (C) corresponde a la glicerina que es nuestro agente plastificante con 3 niveles, por lo tanto, este ensayo contó con 15 tratamientos, con 12 repeticiones para cada uno.

Para la elaboración del bioplástico se inició con la preparación de las mezclas las cuales se realizaron en 15 vasos de precipitación de 500 ml de cada tratamiento, para cada ensayo que contenía quitosano se inició con la disolución por medio del ácido acético y agua destilada, luego se procedió a calentar la mezcla con la queratina hasta evaporarla a 250 ml la cual se añadió en los 12

moldes prefabricados, secándoles en la estufa a 40° c durante 24 horas. Terminado el desmoldeo de las biopelículas se inició con el corte de las probetas de cada mezcla en total de 12 repeticiones por cada muestra.

3.1.4. Pruebas sensoriales

Se implementaron pruebas preliminares de tipo sensorial, al resultado del diseño experimental en la elaboración de las biopelículas. Durante la ejecución de las pruebas sensoriales, se evaluó cualitativamente a los distintos compuestos con sus variados porcentajes de agentes plastificantes, según se muestra en la tabla 5, con el fin de encontrar las biopelículas con mejores características para las pruebas físico-mecánicas y biodegradables, por medio de un rango de valoración de la tabla 6.

Tabla 5.

Valoración Cualitativa de las Biopelículas

Capacidad de formar Biopelícula			
SI		5	
NO		0	
Facilidad de Moldeo		Uniformidad	
Fácil	5	Lisa	5
medio	3	medio lisa	3
difícil	1	arrugada	1
Transparencia		Estabilidad	
100%	5	muy bueno	5
75%	4	bueno	4
50%	3	aceptable	3
25%	2	regular	2
0%	1	muy mala	1

Tabla 6.

Rango de la valoración

Rango	Dictamen
20-11	aceptable
0-10	inaceptable

3.1.5. Ensayos para la determinación de las propiedades físico-mecánicas**3.1.5.1. Ensayo de tracción-deformación en un sentido:**

Las pruebas se realizaron en el laboratorio de Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros (CIAP), ubicado en la Escuela Politécnica nacional del Ecuador, siguiendo la norma ASTM D882-14 *Standart Test Method For Tensile Properties Of Plastics*. La evaluación se realizó utilizando la maquina universal de ensayos y el equipo medidor de espesores de una apreciación de 0,001 mm. Las condiciones empleadas en los ensayos fueron de una velocidad de 50 mm/min y a una temperatura de 19° C.

Las propiedades de tracción determinadas por este método de ensayo son importantes para la identificación y caracterización de materiales para fines de control y especificación. Este método de ensayo aplica a los plásticos en forma de láminas delgadas y películas de menor de 1 mm. Las propiedades de tracción pueden variar con el espesor de la muestra, el método de preparación, la velocidad de ensayo, el tipo de mordazas utilizadas, y la forma de medir la extensión.

Para los análisis de tracción se determinó la dimensión de las probetas de acuerdo con la norma ASTM D882-10 donde:

b, ancho: 20 mm

h, espesor menor a 1 mm

l_3 , largo total de la probeta 100 mm
 l_0 , depende del tipo del material

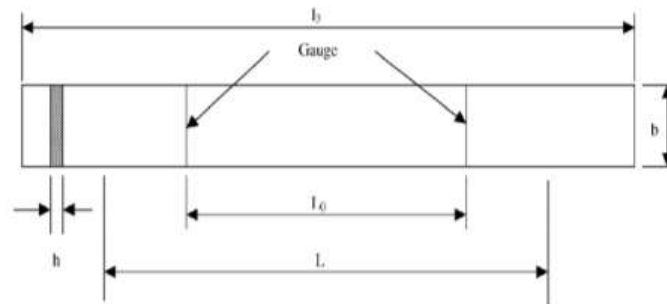


Figura 10. Probeta rectangular de acuerdo con la norma ASTM D882-10
 Tomado de (Carolina, 2012)

3.1.5.2. Identificación de los tipos de plástico de acuerdo con los resultados de Esfuerzo- deformación

A partir de los ensayos de esfuerzo-deformación se clasifican, los polímeros en cuatro categorías generales, como se muestra en la figura a. (Odián, 2001), y de acuerdo con la figura b se identificó una subclasificación de estas biopelículas obtenidas en laboratorio.

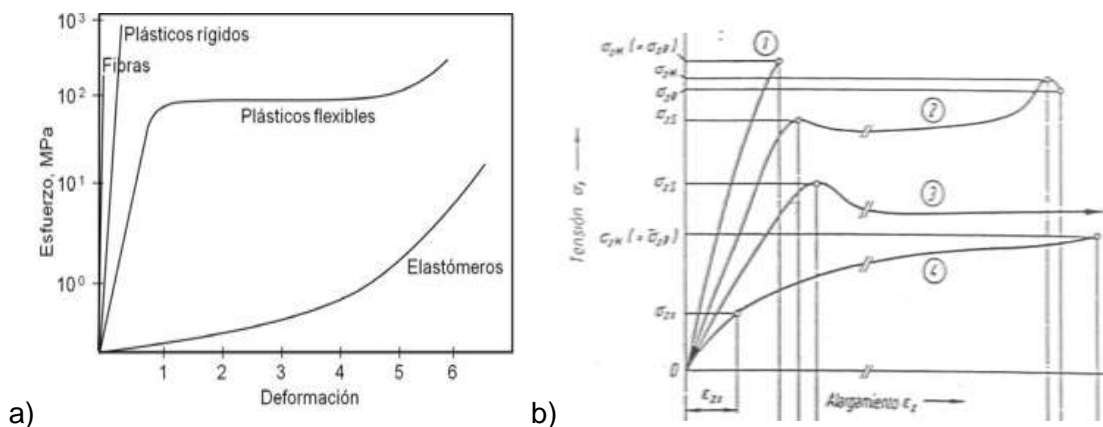


Figura 11. a), Gráficas esfuerzo-deformación para fibras, plásticos y elastómeros y b, Diagramas tensión-deformación para diferentes tipos de plásticos: (1)

plástico quebradizo, (2) plástico deformable, (3) plástico estirable y (4) plástico plastificado

Tomado de, (O dian, 2001) y b tomado de, (Sauer, 1977).

3.1.5.3. Ensayos de biodegradabilidad de las biopelículas por medio de compost

El material en el cual se va a realizar la biodegradabilidad será en humus de características biológicas gracias a su alta carga de microorganismos, aproximadamente de 20.000 millones por gramo de materia seca, en el anexo 7 se muestra la disponibilidad de nutrientes.

El ensayo consistió en colocar las variadas muestras resultantes de las pruebas sensoriales de bioplásticos en mallas plásticas de tipo mosquitero ya que los pequeños orificios de la malla permiten el acceso de los microorganismos y la humedad, y así las muestras degradadas pueden ser fácilmente extraídas del compost. El bioplástico se redujo a un tamaño de 5 cm x 1 cm las cuales fueron almacenadas en recipientes herméticos de capacidad de un litro relleno con humus, y en cada recipiente se almacenaron tres repeticiones por cada tipo bioplástico, y con su testigo de plástico de origen pétreo a una profundidad de 5 cm de la superficie, de manera de asegurar la degradación aeróbica (Escudero, 2011).

Durante la experimentación, se consideró un tiempo de exposición de las biopelículas de 15 días, con una recepción de datos al 2, 5, 10 y al 15 día, por lo cual se evaluó la degradabilidad de los bioplásticos por método gravimétrico analizando la pérdida de peso en base a la siguiente fórmula, (Ruiz, Pastor y Acevedo, 2013).

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{(\text{peso inicial seco} - \text{peso final seco})}{\text{peso inicial seco}} * 100 =$$

3.1.5.4. Ensayo de biodegradabilidad por medio de microorganismos

Para la degradación del bioplástico, se seleccionó la bacteria *Bacillus sp*, para ello se preparó el medio mineral (*Burchnel Has Brot*), este medio se utilizó ya que es caracterizado por poseer ciertos elementos (N, P K) y microelementos exceptuando al carbono para tener al bioplástico como única fuente de alimento.

Se prepararon un total 27 tubos de ensayo por cada muestra con tres repeticiones y 2 tubos de ensayos adicionales para los testigos; ya etiquetados y desinfectados todos los materiales se transfirió 10 ml de la solución mineral y 2 ml de la cepa bacteriana en todos los tubos de ensayos, ya completado la transferencias de soluciones, se adiciona 1 gramo de bioplástico en su respectivo tubo de ensayo y en el testigo se insertó un gramo plástico de origen pétreo, se taponó con algodón estéril los tubos de ensayos para impedir la inserción de otro tipos de bacterias e ingrese el oxígeno para que las bacterias puedan reproducirse.

Terminada con toda la preparación de los ensayos, se inició con la toma de datos de turbidez y absorbancia en el espectrofotómetro marca *Inucell* para obtener los datos iniciales o tiempo "0", para luego iniciar con la incubación de 48 horas a 27° C, después diariamente durante los siguientes cinco días se fueron receptando datos de turbiedad y absorbancia para verificar la biodegradabilidad de las biopelículas.

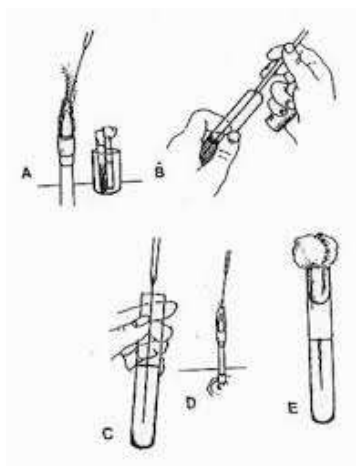


Figura 12. Esquema general del ensayo

Tomado de (RUZAL, S., 2017).

3.1.6. Análisis de resultados

Usando los resultados de las variables físico-mecánicas y biodegradables por medio de compost y microorganismos aplicados en los diferentes tipos de bioplásticos, se realizaron análisis de normalidad según Shapiro Wilks y análisis de varianza (ANOVA) según Tukey, el cual permite probar hipótesis referidas a los parámetros establecidos en el diseño experimental por medio del programa *STADISTICA e Infostat*.

4. CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1. Caracterización de la solución de queratina análisis de sulfuros

En la tabla 7 se muestra el resumen de los resultados de las diferentes corridas realizadas para la obtención de queratina.

Tabla 7.

Concentración de sulfuros S-2 mg/L

	Sulfuro de sodio	Metabisulfito de Sodio	Enzima KINGZYME VP
Muestra 1	2890	10440	5400
Muestra 2	2645	11880	6450
Muestra 3	3120	11320	10960
Muestra 4	2128	10245	3440

En la tabla 7 se muestra los variados resultados de sulfuros, los cuales se detalla que la muestra 3, fue la de valor mayor concentración de sulfuros se halló durante todo el proceso a contrariedad de la última muestra 4, que se encontró con los valores más bajos de sulfuro (S-2 mg/L), esto se debe al momento en que

la muestra 4 se realizó la agitación mecánica y no manual durante el primer proceso del tratamiento con sulfuro de sodio.

4.2. Análisis de grado de hidrólisis en Celdas Conway

Caracterización de las muestras de solución de queratina, los cuales se muestran los resultados en la siguiente tabla 8, presentándose los grados de hidrólisis, con su gasto de HCl.

Tabla 8.

Grado de Hidrólisis

Muestra de queratina	Gasto de HCL ml	C (Concentración de grupo amino libres)	°H (%)
Muestra 1	0.05	3.2018E-06	0.1450837
Muestra 2	0.028	1.12063E-4	0.0812
Muestra 3	0.08	3.2018E-04	0.2321339
Muestra 4	0.02	8.0045E-06	0.05803348

En la tabla 8 la muestra 1 representa un mayor grado de hidrólisis de 0.1450837 % y en la muestra 2 se encuentra la solución de queratina con el valor de 0.0812 % el más bajo porcentaje, para la elaboración del bioplástico se utilizaron todas las muestras ya que, a pesar de presentar muy bajos porcentajes de hidrólisis, las soluciones de queratina presentaban buenas características, las cuales no presentaron restos de plumas y siendo aptas para la aplicación en la elaboración de bioplástico.

4.3. Valorización sensorial de las películas biodegradables

En la Tabla 9 se muestran los resultados, se evaluó la capacidad de formación de película y sus características.

Tabla 9.

Pruebas sensoriales de las biopelículas

Tratamientos	Capacidad de formar Biopelícula	Facilidad de Moldeo	Transparencia	Lisa	Estabilidad	Resultados	
(A1B1C1)	5	3	2	3	1	14	Aceptable
(A1B1C2)	5	1	2	1	1	10	inaceptable
(A1B1C3)	5	1	2	3	5	16	Aceptable
(A2B2C1)	5	1	3	3	5	17	Aceptable
(A2B2C2)	5	3	2	3	4	17	Aceptable
(A2B2C3)	5	1	2	3	3	14	Aceptable
(A3B3C1)	5	1	2	1	1	10	inaceptable
(A3B3C2)	5	1	1	1	2	10	inaceptable
(A3B3C3)	5	5	3	3	2	18	Aceptable
(A4B4C1)	0	0	0	0	0	0	inaceptable
(A4B4C2)	0	0	0	0	0	0	inaceptable
(A4B4C3)	0	0	0	0	0	0	inaceptable
(A5B5C1)	5	5	5	5	5	25	Aceptable
(A5B5C2)	5	5	5	5	5	25	Aceptable
(A5B5C3)	5	5	5	5	5	25	Aceptable

Dando paso a las biopelículas de calificación que estuvieron dentro del rango 11 a 20 ya que son consideradas aceptables, entre se hallaron 9 muestras aceptables (A1B1C1, A1B1C3, A2B2C1, A2B2C2, A2B2C3, A3B3C2, A5B5C1, A5B5C2 y A5B5C3).

Se comprobó que las biopelículas conformadas de 100% de queratina en diversas concentraciones de glicerina, resultaron cristalinas y quebradizas todo lo contrario de las características propias de un bioplástico, por lo tanto, no se logró formar una biopelícula.

De la misma forma se verificó que a mayor concentración de queratina menor transparencia se verificaba en las biopelículas, ya que entre estos dos componentes de quitosano y queratina al interactuar no formaban una mezcla completamente homogénea, fruto de la incompatibilidad de estas dos proteínas

4.4. Propiedades físico-mecánicas

4.4.1. Ensayo de Tracción

En la tabla 10. se presentan los resultados producto de los ensayos de tracción de láminas plásticas delgadas, estos valores corresponden al promedio de las repeticiones por tratamiento que se implementó en el ensayo de tracción correspondiente del Anexo 8.

Tabla 10.

Resultados de las propiedades físico-mecánicas de los bioplásticos

Tratamientos	Espesor mm	Factor de rotura (N/m)	Fuerza de Tensión (MPa)	Rotura de Elongación (%)
(A1B1C1)	0.1791	308	1.79	22
(A1B1C3)	0.1715	498	2.97	12
(A2B2C1)	0.2192	663	3.09	2.8
(A2B2C2)	0.18693	731	3.086	11
(A2B2C3)	0.272	656	2.4	39
(A3B3C3)	0.1982	832	4.18	11
(A5B5C1)	0.2067	2280	11	37
(A5B5C2)	0.1702	4140	24.4	27
(A5B5C3)	0.1372	3280	24	35

En la tabla 10. se muestra la comparación de los resultados en conjunto con los tratamientos y las variables realizadas para el ensayo de tracción, de acuerdo con la gráfica se evidencia la diferencia significativa de las mezclas de 100% de quitosano (A5B5C2) que aportan mejores características en el factor de rotura de 4140 N/m y fuerza de tensión de 24.4 MPa y con peores características de los mismo factores se encuentra el tratamiento (A1B1C1) con 308 N/m en factor de rotura y 1.79 MPa de fuerza de tensión, el cual posee mayor concentración de queratina de un 50%, mientras que en rotura de elongación se evidencia una dispersión de resultados en las diferentes concentraciones de queratina y

quitosano como mejor tratamiento A3B3C3 con un valor de 39% , para dar con el tratamiento de mejor características a continuación se presentaran los análisis estadístico de cada ensayo empleado en las biopelículas.

4.4.2. Factor de rotura

Como se presenta en la tabla 11. se realizó prueba de Kruskal-Wallis ya que esta prueba no es paramétrica, la cual similar a la prueba paramétrica ANOVA de una vía, donde su valor de $p=0.0054$ es menor por lo tanto los tratamientos tienen significancia.

Tabla 11.

Anova de Kruskal-Wallis

Overol Median = 763.500;
Factor de Rotura (N/m) (diseño experimental ESTADISTIC)
Independent (grouping) variable: Tratamientos
Chi-Square = 21.73333 df = 8 p =0 .0054

En base a los resultados obtenidos se identificó cuáles son los tratamientos de mayor diferencia significativa. En el primer caso los tratamientos de A5B5C2 con el tratamiento A1B1C1 da un valor de $p=0.00072$ y A5B5C3 con el tratamiento A1B1C3 da un valor de $p=0.00419$ por lo tanto estos valores muestran que p es menor a 0.05 manteniendo diferencias significativas entre los tratamientos

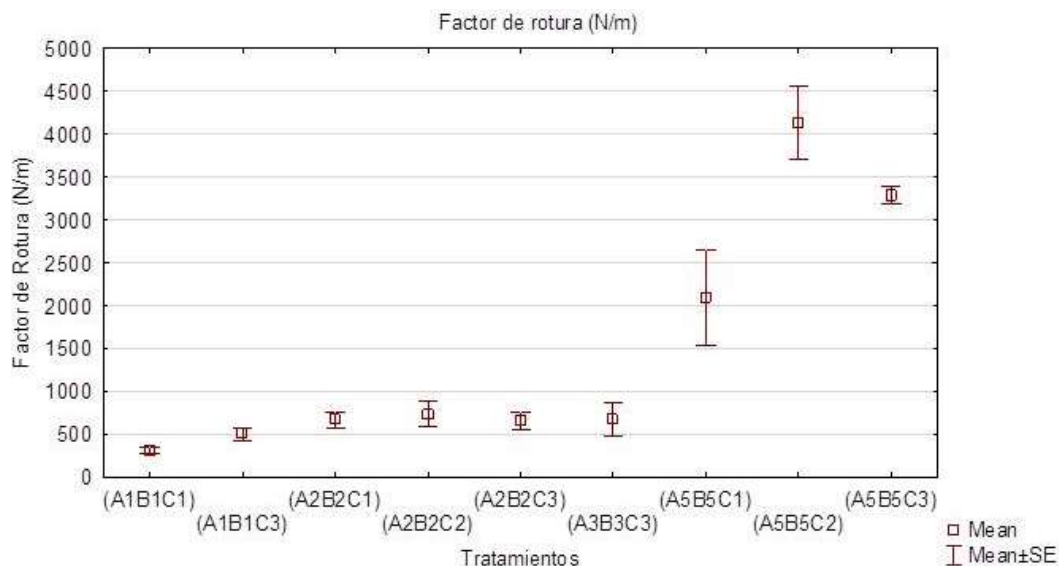


Figura 13. Gráfica de factor de rotura (N/m) agrupados por tratamientos

Como se observa en la figura 13. se da la representación de los datos obtenidos de la tabla anterior, por lo cual se demuestra que el mejor tratamiento en factor de rotura es la mezcla A5B5C2, el cual está compuesto de 100 % quitosano y 15% de glicerina y en conjunto con no mucha diferencia significativa el tratamiento A5B5C3 igualmente de 100% y de 17% de glicerina, dándose a entender que al sobrepasar el 15% de glicerina no mejora la condición del factor de rotura en la biopelícula.

Los tratamientos que poseen mezcla de queratina y quitosano, se presenta como mejor tratamiento en factor y rotura el A3B3C3 a pesar de tener una mayor dispersión como se indica en la imagen.

4.4.3. Fuerza de Tensión

Analizado el nivel de significancia el cual dio un valor de $p=0.008$, se procedió a realizar un análisis propio de Kruskal- Wallis de comparaciones múltiples de rangos medios para todos los grupos.

Tabla 12.

ANOVA de Kruskal-Wallis

Anova Kruskal-Wallis test
 Median Test, Overall Median = 3.73000;
 Fuerza de Tensión [MPa]
 Independent (grouping) variable: Tratamientos
 Chi-Square = 26.73333 df = 8 p = .0008

Se identificó los tratamientos que representan una mayor significancia ya que presentan valores de p menores a 0.05 entre ellos se encuentra la mezcla A5B5C2 - A1B1C1 $p=0.00246$, A5B5C3 – A1B1C1 $p=0.00220$ y A5B5C2 – A2B2C3 $p= 0.02899$, A5B5C3 – A2B2C3 $p= 0.02640$, presentando valores de p menores a 0.05 mientras que las mezclas de A5B5C2 – A5B5C3 y entre A1B1C1 – A2B2C3 no presentan diferencias significativas a nivel estadístico.

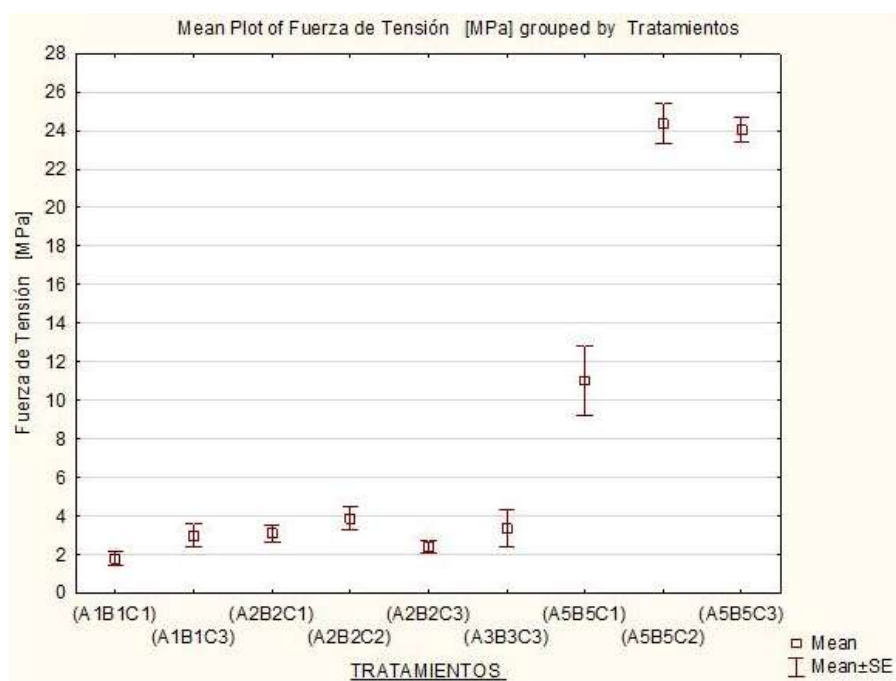


Figura 14. Mean Plot of Fuerza de Tensión [MPa] grouped by Tratamientos

Conociendo los tratamientos de mayor diferencia significativa se procedió a realizar un plot de cajas y bigotes con la media y el estándar de error, como resultado se muestra el mejor tratamiento en relación con la fuerza de tensión que en este caso es la mezcla A5B5C2 con una fuerza de tensión con una media

de 37.6 (MPa), el cual es una biopelícula formada de quitosano con un agregado del 15% de glicerina, seguido del tratamiento A5B5C3 realizado con quitosano y agregado de 17% de glicerina el también presentan buenos valores de Fuerza de Tensión con una media de 37.4 (MPa)

4.4.4. Rotura de elongación

Obtenido los resultados de los análisis estadísticos en el programa se determinó que sus valores de fuerza de tensión producto de los diferentes tratamientos no son paramétricos y se procedió a una Test de ANOVA Kruskal-Wallis para estos tipos de datos con un valor de p menor a 0.05 como se muestra en la tabla 13. por lo tanto, existe significancia entre ciertos tratamientos.

Tabla 13.

ANOVA

Anova Kruskal-Wallis test
Median Test, Overall Median = 24.0000; Elongation at Break Independent (grouping) variable: Tratamientos Chi-Square = 17.71948 df = 8 p = .0234

Con el resultado dado en el análisis el cual dio un valor de $p= 0.008$, se procedió a realizar un análisis propio de Kruskal- Wallis de comparaciones múltiples de rangos medios para todos los grupos. De igual manera se identificó los tratamientos que representan una mayor significancia ya que presentan valores de p menores a 0.05 entre ellos se encuentra la mezcla A5B5C1 – A2B2C, $p=0.02341$ y A5B5C3 – A2B2C1, $p= 0.04768$, mientras que las mezclas de A5B5C1 – A5B5C3 no presentan diferencias significativas a nivel estadístico.

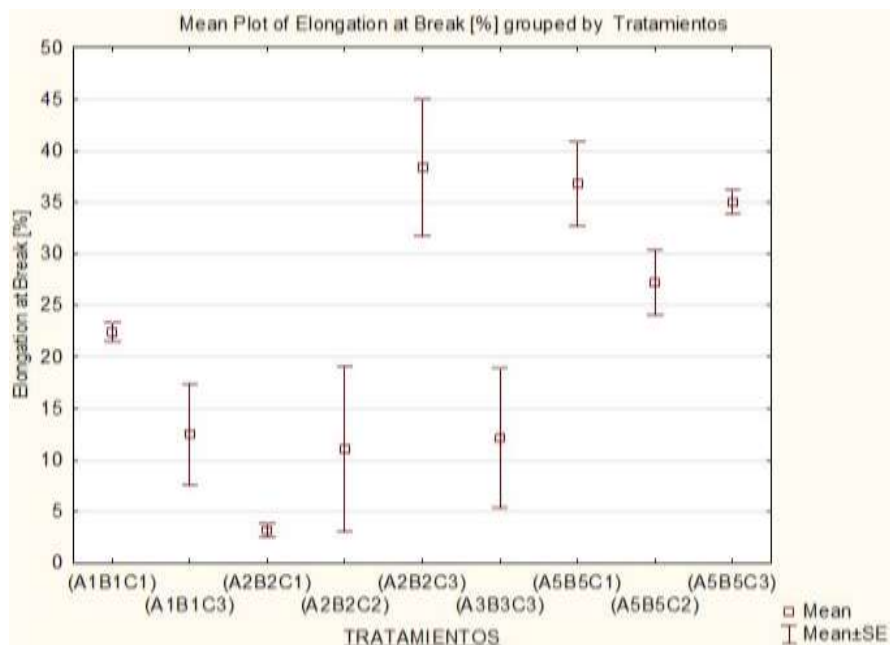


Figura 15. Mean Plot of elongation of break [%] grouped by Tratamientos

Como resultado se muestra el mejor tratamiento en relación con la fuerza de tensión que en este caso es la mezcla A2B2C3 con una elongación de rotura de 32.9 %, el cual es una biopelícula formada de quitosano con un agregado del 15% de glicerina, seguido del tratamiento A5B5C1 realizado con quitosano y agregado de 17% de glicerina el también presentan buenos valores de Fuerza de Tensión con una media de 30.7 (MPa).

Categorización de las biopelículas de acuerdo con el esfuerzo vs deformación

A partir de su comportamiento representado en los gráficos producto de la evaluación de tensión- deformación se puede categorizar el tipo de material según como se muestra en la siguiente tabla 14, basado los resultados obtenidos en el anexo 9.

Tabla 14.

Clasificación de las biopelículas

Tratamientos	Categorización	Tipo
(A1B1C1)	Plástico Flexible	Plástico Plastificado

(A1B1C3)	Plástico Flexible	Plástico Plastificado
(A2B2C1)	Plástico Flexible	Plástico Plastificado
(A2B2C2)	Plástico Rígido	Plástico Deformable
(A2B2C3)	Plástico Flexible	Plástico Plastificado
(A3B3C3)	Plástico Flexible	Plástico Plastificado
(A5B5C1)	Plástico Flexible	Plástico Deformable
(A5B5C2)	Plástico Flexible	Plástico Deformable
(A5B5C3)	Plástico Flexible	Plástico Deformable

4.5. Biodegradación aeróbica en compostaje

En la tabla 15. se presentan los siguientes resultados de la biodegradabilidad aeróbica, se aprecia que en los primeros días existe un alto grado considerable de degradación, apreciándose que en todos los tratamientos perdieron más de la mitad del peso inicial en comparación con el testigo que no sufrió ninguna variedad en su peso o en su apariencia física.

Tabla 15.

Porcentaje de la pérdida de peso en el ensayo de biodegradabilidad durante 15 días

TRATAMIENTOS	0	5	10	15
(A1B1C1)	0	59.07	69.03	79.13
(A1B1C2)	0	60.75	63.89	69.40
(A1B1C3)	0	61.46	72.28	76.95
(A2B2C1)	0	67.76	75.15	76.27
(A2B2C2)	0	51.75	57.13	61.54

(A2B2C3)	0	65.72	76.66	81.17
(A3B3C1)	0	38.73	41.85	51.75
(A3B3C2)	0	42.66	45.91	54.04
(A3B3C3)	0	46.67	51.18	58.01
(A5B5C2)	0	43.06	49.33	70.61
TESTIGO	0	0.00	0.00	0.00

Basándose en los datos obtenidos el tratamiento que logra una mayor degradación en la pérdida de peso 15 días es el A2B2C3 con el 81.17%, el cual consta de una concentración de 70 % de quitosano y de 30% queratina con un agregado del 17% de glicerina. De acuerdo a los resultados también se presenta el tratamiento que logro un bajo porcentaje de pérdida de peso es la biopelícula A3B3C1 con 51.75%, el cual constituye de una concentración del 90% de quitosano y 10% de queratina incorporado 10% de glicerina, además en se presenta en la mayoría de tratamientos un comportamiento similar en la forma de degradarse a comparación del tratamiento A5B5C2 el cual está compuesto de 100% con 15% glicerina de muestra una actividad diferente ya que al día 10 en adelante acelero su proceso de degradación.

Analizando las tendencias de los porcentajes de peso en relación con las concentraciones de glicerina en mayores cantidades de 17% se experimentan altos valores de pérdida de peso, mientras que a menor concentración de glicerina se dificulta la degradación en las biopelículas.

Análisis Estadístico

Para una validación de los resultados obtenidos se empleó un análisis estadístico de normalidad de Shapiro Wilks, el cual se analizó los resultados de pérdida de peso del día 15, como resultado un valor de p de 0.043 esto quiere decir que tiene una distribución normal.

A continuación, se realizó un análisis de varianza, Test de Tukey para la identificación de las diferencias significativas. El ANOVA el cual arrojó como resultado un valor de p menor de 0.0001 en los tratamientos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
DÍA 15	30	0.84	0.77	19.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15539.31	9	1726.59	11.64	<0.0001
Tratamientos	15539.31	9	1726.59	11.64	<0.0001
Error	2965.64	20	148.28		
Total	18504.95	29			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=35.20769

Error: 148.2819 gl: 20

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
10	0.00	3	7.03	A
7	51.75	3	7.03	B
8	58.01	3	7.03	B
5	61.54	3	7.03	B
2	69.40	3	7.03	B
9	70.61	3	7.03	B
4	76.27	3	7.03	B
3	76.95	3	7.03	B
1	79.13	3	7.03	B
6	81.17	3	7.03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 16. Test Tukey en la pérdida de peso en compost

Los tratamientos resultantes de la prueba realizada muestran 2 grupos el cual el tratamiento 10 el cual corresponde al testigo no se produjo ninguna pérdida de peso durante la experimentación, mientras que los demás tratamientos que corresponden al grupo B mantuvieron una pérdida peso similar, es decir no existe diferencia significativa ya que estos bioplásticos perdieron la mayoría de su peso inicial.

4.6. Biodegradación por medio de microorganismos

Ensayos con respecto a la turbidez

En la siguiente tabla 16. se presentan los resultados basados en las mediciones de turbidez de cada tratamiento, se puede considerar que los cambios de turbidez con respecto a las horas transcurridas confirman que los microorganismos están degradando tanto el bioplástico con los diferentes tratamientos y el testigo de origen pétreo también se existe una biodegradación, ya que la *Bacillus sp.*, tiene la capacidad de degradar este tipo de plástico.

Tabla 16.

Ensayos con respecto a la turbidez

Tratamiento	horas	
	0	168
(A1B1C1)	36.00	139.00
(A1B1C3)	31.03	170.33
(A2B2C1)	19.00	132.67
(A2B2C2)	18.67	567.67
(A2B2C3)	34.67	318.33
(A3B3C3)	48.00	138.33
(A5B5C1)	25.33	36.00
(A5B5C2)	34.00	10.67
(A5B5C3)	30.33	7.00
PH(TESTIGO)	29	360

Basado en la gráfica 20. se logró determinar que efectivamente el tratamiento de mayor turbidez es el A2B2C2 tiene un alto valor de turbidez y su comportamiento tiene una tendencia a una degradación más rápida, mientras que en los tratamientos que contienen 100% de quitosano con variabilidades de glicerina tienen los valores más bajos de turbidez como el tratamiento (A5B5C3) que presentó unos valores más bajos que el inicial por lo cual se comprueba que el quitosano mantiene propiedades antimicrobianas.

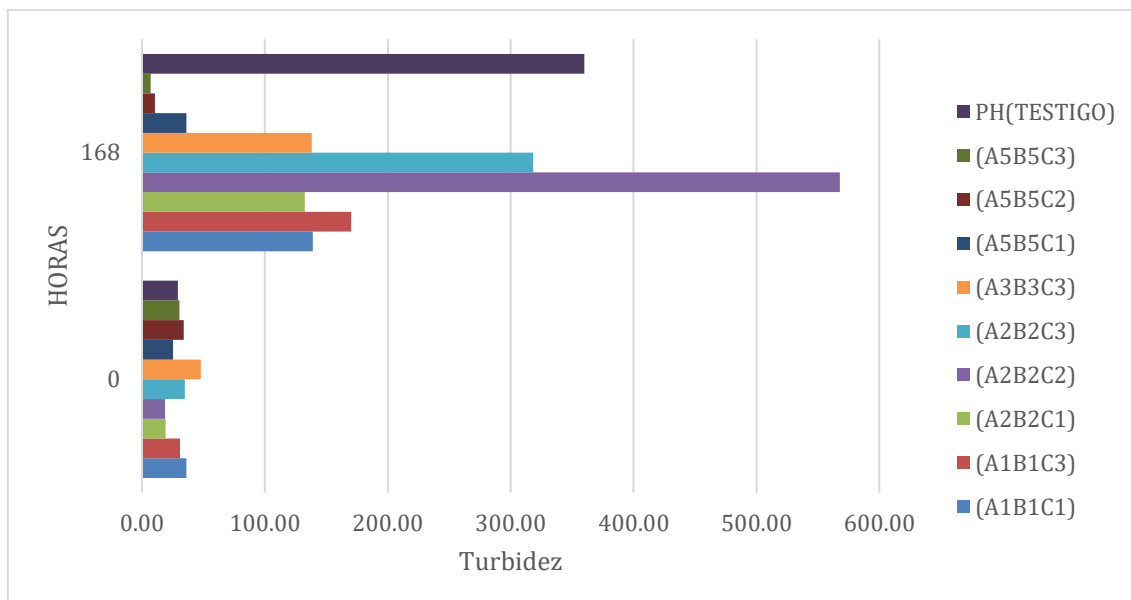


Figura 17. Ensayos con respecto a la turbidez de las biopelículas

Análisis Estadístico

Para una validación de los resultados obtenidos se empleó un análisis estadístico de normalidad de Shapiro Wilks, el cual se analizó los resultados turbidez, como resultado un valor de p menor de 0.0001 esto quiere decir que tiene una distribución normal ya que este valor es menor a 0.05.

A continuación, se realizó un análisis de varianza, Test de Tukey para la identificación de las diferencias significativas. El ANOVA el cual arrojó como resultado un valor de p de 0.0007 en los tratamientos.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
168 hr	29	0.73	0.60	70.56

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	901646.19	9	100182.91	5.70	0.0007
Tratamientos	901646.19	9	100182.91	5.70	0.0007
Error	333980.50	19	17577.92		
Total	1235626.69	28			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=395.12027

Error: 17577.9211 gl: 19

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
9	7.00	3	76.55	A
8	10.67	3	76.55	A
7	36.00	3	76.55	A
3	132.67	3	76.55	A B
6	138.33	3	76.55	A B
1	139.00	3	76.55	A B
2	170.33	3	76.55	A B
5	318.33	3	76.55	A B C
10	444.50	2	93.75	B C
4	567.67	3	76.55	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 18. Test Tukey en los ensayos de turbidez

Los tratamientos resultantes de la prueba realizada muestran 3 grupos (A, B y C) estadísticamente con diferencias significativas por lo tanto el tratamiento 9 el cual corresponde al (A5B5C3) del grupo A mantiene una diferencia significativa con el tratamiento 10 (Testigo) del grupo B y el tratamiento 4 (A2B2C2) del grupo D.

Ensayos de peso en relación con el tiempo

En la siguiente etapa se presenta los resultados de las pérdidas de peso de los presentes tratamientos analizados durante las 168 hr que duro el análisis de biodegradación del bioplástico los cuales se encuentran representados en la siguiente tabla 17

Tabla 17.

Pérdida de peso durante la biodegradación.

Tratamientos	Pérdida de peso (gr)
(A1B1C1)	0.6000
(A1B1C3)	0.4333
(A2B2C1)	0.5333
(A2B2C2)	0.6333
(A2B2C3)	0.4667
(A3B3C3)	0.3330
(A5B5C1)	0.4000
(A5B5C2)	0.2000
(A5B5C3)	0.1867
PH(TESTIGO)	0.1000

En la tabla 17, se indica cuáles son los tratamientos que tienen el índice de mayor pérdida de peso lograron alcanzar entre ellos esta (A2B2C2 con 0.633 gr y A1B1C1 con 0.6 gr), son los que mayor pérdida de peso lograron alcanzar, mientras que los tratamientos de (A5B5C3 con 0.1867 gr y A5BB5C2 con 0.2 gr) son aquellos que menor pérdida de peso obtuvieron, según los datos obtenidos en la biodegradación.

Análisis de la turbidez en relación de la pérdida de peso en los tratamientos

Finalmente se analizó los resultados obtenidos en comparación con los datos de la pérdida de peso y la turbidez obtenida en las 168 horas establecidas para la biodegradabilidad, se denota una tendencia clara en los resultados por lo que se implementaron graficas de columnas para demostrar cómo se relaciona los cambios de turbidez y la pérdida de peso del bioplástico obtenido.

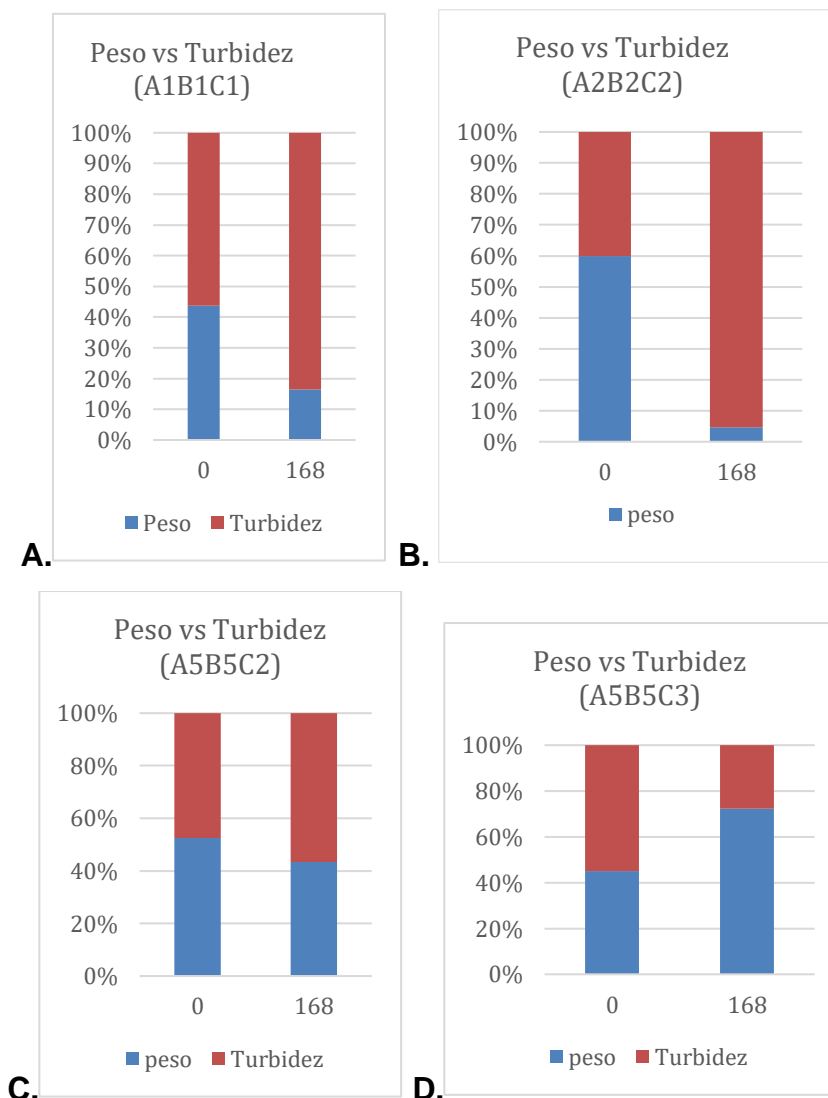


Figura 19. Representación gráfica de la pérdida de peso en relación con la Turbidez.

En las siguientes imágenes se representa los tratamientos que resultaron con los valores más altos y bajos de turbidez y pérdida de peso, en fin los que lograron mayor pérdida de peso, se ven relacionados con altos valores de turbidez, por lo tanto mientras que a mayor concentración de queratina en el caso del tratamiento A1B1C1 y del caso A2B2C2 de la imagen A y B además de poseer características físico mecánicas pobres logro una mayor pérdida de peso, caso contrario los que obtuvieron bajos valores de turbidez, su peso no vario significativamente por lo tanto no se biodegrado significativamente durante los tiempos establecidos con los tratamientos de (A5B5C3 Y A5BB5C2) de la gráfica C y D que contenían 100% quitosano en sus componentes.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La queratina obtenida a partir de plumas de aves de corral utilizando hidrólisis, formó una solución líquida sin ningún tipo de residuo de plumas, lo que significa que es un material idóneo para la formulación de bioplástico

Como se muestra en los resultados en mezcla de queratina y quitosano, basándose con una de fuerza de tensión de 4.18 MPa y en el factor de rotura de 832 N/m, se considera como mejor tratamiento el A3B3C3, el cual posee 90% de quitosano con 10% de queratina incorporado un 17% de glicerina, pero con una baja rotura de elongación del 11%, caso contrario del A2B2C2 es el mejor tratamiento en rotura de elongación con un 39% se da a conocer que la queratina no da características firmes y resistentes al bioplástico, pero dan una mayor elasticidad al bioplástico.

Sin embargo, los testigos de 100% quitosano y 0% de queratina aportaron diferencias altamente significativas, con mejores características en comparación de los tratamientos que poseían mezcla de estos dos principales componentes, esto quiere decir que la queratina baja la calidad de las biopelículas, debido a que estas sustancias en solución se hallan en un pH de 7 la queratina y el quitosano en un pH de 4, además de que poseen un bajo factor de compatibilidad.

La concentración óptima del agente plastificante fue del 15%-C2 debido que en los diferentes tratamientos se observó que ofrecía mejores características ya que al sobrepasar de esta concentración baja de nuevo la calidad del bioplástico en los diferentes tratamientos.

Partiendo de los ensayos de tracción se logró identificar el tipo de plástico biodegradable, los cuales la mayoría de los tratamientos forman parte del grupo

flexible exceptuándose el A2B2C2 al grupo del plástico rígido, concluyendo que la mayoría de los tratamientos son de tipo flexible y plastificado que son condiciones aptas para fundas, recubrimientos de alimentos entre otros usos que se necesita flexibilidad en el material.

Al realizar dos diferentes metodologías de biodegradabilidad se verificó que la mezcla de los componentes es efectivamente biodegradable siendo el quitosano, la queratina y la glicerina una influencia para biodegradabilidad.

El grado de biodegradabilidad de las biopelículas se dio entre un 81.17% como el máximo porcentaje en degradarse en el tratamiento A2B2C3 y de 51.75 % siendo el porcentaje mínimo de degradación en compostaje en el tratamiento A3B3C1.

En la biodegradabilidad de compost a mayor concentración de queratina en los tratamientos se degradaba en mayor porcentaje, caso contrario los tratamientos que cuentan con las concentraciones optimas de mezcla, es decir de mejor característica físico-mecánicas tienen valores bajos de pérdida de peso en comparación con el resto de los tratamientos.

Las pruebas realizadas en compost y por medio de microorganismos aseguran la utilización de estos bioplásticos para procesos de compostaje o que terminen en rellenos sanitarios sin lograr afectación ya que en un tiempo de 15 días todos los tratamientos llegan a sobrepasar el 50% de pérdida peso.

Por medio de la obtención de queratina producto de los residuos de plumas de aves de corral y con la mezcla de quitosano comercial, incorporando glicerina como agente plastificante se logró producir plástico biodegradable.

5.2.Recomendaciones

Para facilitar el proceso de hidrolisis, terminado los procesos de lavado y secado se recomienda realizar un triturado o molido de las plumas, para su inserción en las chaquetas de calentamiento ahorrando tiempo y desperdicio de material.

Para un mejor desmolde de las biopelículas se recomienda que la base del molde sea de acetato de buen espesor para evitar el cuarteamiento de la biopelícula o la dificultad del desmolde.

Tanto las bases de acetato como las paredes de vidrio de los moldes deben ser sellados con silicona fría ya que la mezcla al ser muy líquida logra escurrirse fácilmente.

Para dar una mejor caracterización del bioplástico debe sometido en diferentes condiciones se recomienda realizar más análisis, ya que los materiales plásticos no solo terminan en rellenos sanitarios o en el suelo, un gran porcentaje termina en mares y ríos afectando a la vida marina y para ello sería importante determinar la solubilidad de estas biopelículas para determinar cuánto tiempo se mantienen en los cuerpos hídricos antes de su completa o parcial disolución y si esta afectaría a la vida marina.

Con los datos obtenidos en la clasificación de plástico biodegradable según la tracción se recomienda fabricar prototipos por lo cual es óptima su uso.

REFERENCIAS

- Almeida, A., Ruiz, J. A., López, N. I. & Pettinari, M. J. (2004). *Bioplásticos: una alternativa ecológica*. *Química Viva*, 3(3). ASTM D6400-99 “Especificación Standard para los plásticos compostables”. Recuperado el 17 de diciembre de 2019 de <https://www.redalyc.org/pdf/863/86330305.pdf>
- Sosa, A., (2011) *Los plásticos: materiales a la medida*. Recuperado el 14 de mayo de <http://www.4shared.com/document/6YbK2bKv/m.html>.
- Andersen, P. J., Ong, S., Christensen, B. J. And Hodson, S. K. *Compositions and methods for manufacturing starch-based compositions*. US6168857 U.S. PTO. 2001. Recuperado el 25 de junio de 2019 de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612012000100021
- Barnes, D.A., Galgani, F., Thompson, R.C. & Barlaz, M. (2009). *Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments*. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* (364) 1985-1998. Recuperado el 6 de febrero de 2020 de <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rstb.2008.0205>.
- Brito, G. F., Agrawal, P., Araújo, E. M., & Mélo, T. J. A. (2011). *Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes*. *Revista eletrônica de materiais e Processos*, 6(2), 127-139. Recuperado el 14 de agosto de 2019 de http://www.etecgv.com.br/docs/atividades/quimica/q_qualitativa_rosana_2le2h.pdf
- Hernández, C., Varo, W., & Barragán, C. (2008). *Utilización de residuos para cascara de camarón para la producción de quitina*. Recuperado de 15 de julio de [http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/Hernandez-NunezCarlosManuel\(pp659-666\)/659-666.pdf](http://www.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otrasinstituciones/Hernandez-NunezCarlosManuel(pp659-666)/659-666.pdf)

- Castillo, R., Escobar, E., Fernández, D., Gutiérrez, R., Morcillo, J., Núñez, N., & Peñalosa, S. (2015). *BIOPLÁSTICO A BASE DE LA CÁSCARA DEL PLÁTANO*. *Revista de Iniciación Científica*, 1(1), 34-37. Recuperado el 10 de diciembre de 2019 de <https://revistas.utp.ac.pa/index.php/ric/article/view/346/339>
- CHALEAT, C., HALLEY, P., & TRUSS, R. (2008). *Properties of a plasticized starch blend. Part 1: Influence of moisture content on fracture properties. Carbohydrate Polymers*, 71(4), 535–543. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.06.029
- Contreras, L., Vargas, L., y Ríos R., (2018). *Procesos De Fabricación En Polímeros Y Cerámicos*. Recuperado el 25 de agosto de 2019 de https://books.google.com.ec/books?id=gSejDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Procesos+De+Fabricaci%C3%B3n+En+Pol%C3%ADmeros+Y+Cer%C3%A1micos&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj5_rCy7ODnAhVtdt8KHaxPDx4Q6AEIJzAA#v=onepage&q=Procesos%20De%20Fabricaci%C3%B3n%20En%20Pol%C3%ADmeros%20Y%20Cer%C3%A1micos&f=false
- Contreras, C., Bravo, L. F. (2018). *Procesos de fabricación en polímeros y cerámicos*. Bogotá: Ediciones de la U. doi:9587627431, 9789587627435
- Dangaran, K., Tomasula, P. M., & Qi, P. (2009). *Structure and function of protein-based edible films and coatings. In Edible films and coatings for food applications* (pp. 25-56). Springer, New York, NY.
- Dávila, J. L., Galeas, S., Guerrero, V. H., Pontón, P., Rosas, N. M., Sotomayor, V., & Valdivieso, C. (2011). *Nuevos materiales: aplicaciones estructurales e industriales*. Recuperado el 19 de septiembre de 2019 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/4532o>
- ECOEMBES. (2008). *Informe sobre biodegradabilidad teórica de envases plásticos*, España. Recuperado el 5 de febrero de 2020 de https://www.ecoembes.com/sites/default/files/archivos_estudios_idi/proyecto_bioplasticos_-_resumen_ejecutivo.pdf.
- Enríquez, M., Velasco, R., & Fernandez, A. (2013). *Caracterización De Almidones De Yuca Nativos Y Modificados Para La Elaboración De*

Empaques Biodegradables. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial.

- Enshassi, A., Kochendoerfer, B., & Rizq, E. (2014). *Evaluación de los impactos medioambientales de los proyectos de construcción*. Revista ingeniería de construcción, 29(3), 234-254. Recuperado el 10 de enero de 2020 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-50732014000300002&lng=pt&nrm=iso
- Escudero, L. (2011). *Determinación de la biodegradabilidad y toxicidad de materiales plásticos* (proyecto fin de Carrera. Universidad politécnica de Cartagena).
- Espinel, J. M. N. (1992). *La familia de genes de la queratina 6: caracterización y regulación* (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid).
- Fan, X. (2008). *Valueadded products from chicken feather fibers and protein*. Auburn University. Doctor of Philosophy: 274.
- Florido, L. (2007). *Procedimiento para la obtención de microfibras de queratina a partir de residuos ganaderos*. Inventor. Int. CL.: C08H1/06. Patente. WO2007023199 A, 1.
- Gallardo, M., Montaña, M., Valladolid, M. (2015). *Dos procedimientos para el estudio de las plumas en microscopía óptica*. Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural. Sección biológica, 109, p 65-69.
- Giraldo, J. (2015). *Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano*. University of Concepción, 1-22.
- Giraldo, J. D. (2013). *PROPIEDADES, OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DEL QUITOSANO*.
- GLASSER, W. 1997. *Preparation of N-acylglucosamine polymers from chitosan for chitin fibers and filaments*. Canada Pat CA 2172232. Recuperado el 25 de septiembre de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1027-152X2009000500012&script=sci_arttext
- Gupta, K. M. (2014). *Engineering Materials: Research, Applications and Advances*: Taylor & Francis. FL, U.S. Recuperado el 15 de septiembre de

- 2019 de <https://content.taylorfrancis.com/books/download?dac=C2014-0-30861-7&isbn=9781482257984&format=googlePreviewPdf>
- Harish, K.V. y Tharanathan R.N. (2007). *Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview*. Trends in Food Science & Technology 18, 117–131. Recuperado el 14 de septiembre de 2019 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382011000300011&script=sci_arttext
- Hernández, K. (2013). *Biodegradación de envases elaborados a base de fécula de maíz, papa, caña de azúcar, papel y oxo-biodegradables.*, 1–102.
- Hernández-Núñez, C. M., Varo-Argüello, W. E., Leyva-Reyes, N., Ramírez-Barragán, C. A., Delgado-Fornué, E., & Angel, J. (2008). *Utilización de residuos de cáscara de camarón para la obtención de quitina blanqueada: propuesta de una metodología a base de tratamientos alcalino-ácido y ozono*. Avances en la investigación científica en el CUCBA.
- Herranz, C., Gómez-Sala, B., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., & Cintas, L. M. (2016). *Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin*. International journal of food microbiology, 223, 41-49. [va](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160716300011)
- Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A. N. & Davis, S.S. (2001). Adv. Drug Deliv. Rev. 51: 81-96.
- Interempresas Noticia 9/1/2006 *Basf lanzará al mercado un envase plástico biodegradable*. Recuperado el 15 de septiembre de 2019 de <http://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/Articulo.asp?A=12012>
Fecha de consulta: 17 de diciembre de 2018.
- Jiménez R. Ariosti A. (2010) *Materiales plásticos tradicionales y materiales plásticos biodegradables - posición de inti-plásticos*. Recuperado el 14 de agosto de 2019 de <http://blog.ccoo.es/gallery/17/posicion-inti-sobre-bolsas-de-plastico.pdf>
- Kowalski, M., Krausmann, F., Giljum, S., Lutter, S., Mayer, A., Bringezu, S., Sugim & Weisz, H. (2011). *Methodology and indicators of economy-wide material flow accounting: State of the art and reliability across sources*. Journal of Industrial Ecology, 15(6), 855-876.

- Kozempel, M., & Tomasula, P. M. (2004). *Development of a continuous process to make casein films*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1190-1195.
- Lozada, O., & Alejandra, P. (2009). *Plan de manejo ambiental para la Empresa LP Marcelo Pacheco Cia. Ltda. (Avícola La Pradera)*. Recuperado el 21 de junio de 2019 de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1864>
- Luis Calle Guadalupe, López, *Washington Ruiz, & Verduga, K. (2016). *Obtención de termoplásticos a partir de plumas de pollo*. *Investigación y Desarrollo*, 2(ISSN 1390-7042), 1–4. Recuperado el 17 de julio de 2019 de <http://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/RevFIG/article/download/889/901/>.
- Macedo, Manuel, et al. "*Obtención de un hidrolizado proteico por fermentación sumergida de plumas utilizando Bacillus spp.*" *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, vol. 12, no. 3, 2002, p. 214+. Academic OneFile, Accessed 26 May 2019.
- Mejía, R. J., Martínez, M. T. A., & Lara, P. D. L. (2018). *Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción*. *e-CUCBA*, (9), 17-23.
- Mere Marcos, J. (2009). *Estudio del procesado de un polímero termoplástico basado en almidón de patata amigable con el medio ambiente* (Bachelor's thesis).
- Mohanty, A. K., Misra, M., & Drzal, L. T. (Eds.). (2005). *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites*. CRC press. Recuperado el 21 de septiembre de 2019 de https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=AwXugfY2oc4C&oi=fnd&pg=PP1&dq=+Natural+fibers,+biopolymers+and+bio+composites:+An+Introduction.+Book:+Natural+fibers,+biopolymers+and+biocomposites.+&ots=gMP7Ou_eQU&sig=qHaqobQMtK5twr92dT_3Dq5Fwc&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Moore, G. R. P., Martelli, S. M., Andreo, P. D., Gandolfo, C. A., Machado, R. F. A., Bolzan, A., & Laurindo, J. B. (2005). *Obtenção de Biofilmes a partir de Queratina de Penas de Frango*. *Revista Matéria*, 10(1), 8-13

- Muzzarelli, R. A. (1993). *Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients*. *Carbohydrate Polymers*, 20(1), 7-16. Recuperado el 25 de septiembre de 2019 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144861793900272>
- Odian, G., Principles of polymerization. USA: Wiley-Interscience, 2004. Sauer, J. A., y Pae K. P., "*Mechanical properties of high polymers*", in: Kaufman H. S. (editor), *Introduction to polymer science and technology: An SPE textbook*, (pp. 302–423), New York, USA: Wiley-Interscience Publication, 1977.
- Ogawa, K., & Yui, T. (1993). *Crystallinity of partially N-acetylated chitosans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 57(9), 1466-1469. Recuperado el 30 de septiembre de 2019 de https://scholar.google.com/scholar_url?url=https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb1992/57/9/57_9_1466/_article/-char/ja/&hl=es&sa=T&oi=gsb&ct=res&cd=0&d=11966520852117532783&ei=q_IOXq7bDYGBBy9YP0rWRiA4&scisig=AAGBfm2C9NizX7f_nmQN VjzIXkbgd_GXkw
- Orjuela Palacio, J. M., Lanari Vila, M. C., & Zaritzky, N. E. (2015). *Desarrollo de productos a base de queratina a partir de residuos de la industria avícola*. In *III Jornadas de Investigación, Transferencia y Extensión de la Facultad de Ingeniería*. Recuperado el 19 de septiembre de 2019 de <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/7288>
- Ortega David, Q. C., & Eduar Humberto, H. D. (2017). *Procesamiento de plumas de pollo para la obtención de queratina*. Recuperado de <http://repository.ugc.edu.co/handle/11396/2255>
- Otey, F. And Westhoff, R. *Biodegradable starch based blown films*. US4337181. U.S. PTO. 1982
- Paniagua, M., Ossa, A., y Ruiz, G. (2008). *Características de adhesión entre fibras de queratina y poliéster insaturado*. Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia, 46, p.15-23.
- Pérez, R., Ochoa-Gómez, J., Díaz de Apodaca, E., & Roncal, T., & Cadierno Beitialaringoitia, U., & Torrecilla, J., (2007). *BIOPLÁSTICOS*. Recuperado

- el 14 de octubre de 2019 de
https://www.researchgate.net/publication/257652567_BIOPLASTICOS
- Perez-Gago MB, Krochta JM (2000) *Drying temperature effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein–lipid emulsion films*. *J Agric Food Chem* 48 (7): 2687 – 2692
- Posada-Duque, J. A., & Cardona-Alzate, C. A. (2010). *Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel*. *Ingeniería y universidad*, 14(1), 9-27. Recuperado el 25 de octubre de 2019 de
https://scholar.google.com/scholar_url?url=https://www.redalyc.org/pdf/477/47715438001.pdf&hl=es&sa=T&oi=gsb-ggp&ct=res&cd=0&d=5857707704753639192&ei=4vpOXoi5LMSTmgHLiqL4DA&scisig=AAGBfm2IQYkPxLoEpVC0aYJverTd3Kt5IA
- Ramakrishnan, N., Sharma, S., Gupta, A. y Al Ashwal, BY (2018). *Película bioplástica a base de queratina a partir de plumas de pollo y su caracterización*. *Revista internacional de macromoléculas biológicas*, 111, 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.037>
- Rodríguez Cuesta, Ariel. (2012). *Biodegradabilidad de materiales bioplásticos*. Recuperado el 6 de febrero de 2020 de
https://www.researchgate.net/publication/328676031_Biodegradabilidad_de_materiales_bioplasticos.
- Rodríguez-Pedroso, A. T., Ramírez-Arrebato, M. A., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. L., & Bautista-Baños, S. (2009). *Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos*. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 15(3), 307-317.
- Rojo-Nieto, E., & Montoto Martínez, T. (2017). *Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global*. Recuperado el 14 de enero de 2020 de
https://www.researchgate.net/publication/313011511_Basuras_marinas_plasticos_y_microplasticos_origenes_impactos_y_consecuencias_de_

una_amenaza_global_Marine_litter_plastics_and_microplastic_sources
_impacts_and_consequences_of_a_global_threat

- Royer SJ, Ferrón S, Wilson ST, Karl DM (2018) *Producción de metano y etileno a partir de plástico en el medio ambiente*. PLoS ONE 13 (8): e0200574. Recuperado el 14 de junio de 2019 de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200574>
- Ruíz, F., & Guerrero, B. J. A. (2009). *Aplicación de películas comestibles a base de quitosano y mucílago de nopal en fresa (Fragaria ananassa) almacenada en refrigeración*.
- Ruiz, Mariana, Pastor, Karla, & Acevedo, Adriana. (2013). Biodegradabilidad de Artículos Desechables en un Sistema de Composta con Lombriz. *Información tecnológica*, 24(2), 47-56. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642013000200007>
- RUZAL, S. (2017). *FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA* (Doctoral dissertation, UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES).
- Salazar, M. (2013). *Determinación del método para la obtención de queratina cosmética a partir de plumas gallináceas*. (Trabajo de grado Químico Farmacéutico). Facultad de Ciencia, Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Schrooyen, P. M. M., & Oberthur, R. (2007). *U.S. Patent No. 7,169,896. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office*.
- Sugimoto K. 1999. Preparation and characterization of chitin and chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers* 36: 49-59.
- Tapia, C, Soto, & Albuquerque. (2009). *Efecto antifúngico de quitosano de alto peso molecular en cepas de Candida sp aisladas de muestra clínica. Revista Chilena de Infectología*.
- Thiel, M., Kroeger, C., Nuñez, P., & Pantoja, J. (2013). *Microplásticos*. Chile. Recuperado el 25 de junio de 2020 de <http://www.cientificosdelabasura.cl/archivo/documento/documento/18/B.%20Parte%20%20-%20Microplasticos.pdf>

- Thiex, NJ, Anderson, S., y Gildemeister, B. (2003). *Grasa bruta, extracción de hexanos, alimento, grano de cereal y forraje* (método de Randall / soxtec / sumersión): estudio colaborativo. *Revista de AOAC International*, 86 (5), 899-908.
- Thompson, R. C., Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. John, D. McGonigle, and A. E. Russell. (2004). *Lost at sea: where is all the plastic?* *Science* 304:838.
- Valencia, M. B., 2018. *Obtención de queratina a partir de plumas de la industria avícola mediante hidrólisis enzimática*. Recuperado el junio de 2019 de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/8723>
- Vanegas Hinojosa, M. G. (2014). *Obtención de películas biodegradables a partir de mezclas de quitosano de cáscaras de camarón y agentes plastificantes*.
- Villada, H. S., Acosta, H. A. & Velasco, R. J. (2008). *Investigación de almidones termoplásticos, precursores de productos biodegradables*. *Información tecnológica*, 19(2), 3-14. Recuperado el 12 de septiembre de 2019 de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-07642008000200002&lng=es&nrm=iso

ANEXOS

Anexo 1: Análisis de sulfuros

MÉTODO YODOMÉTRICO:

A) Añadir con bureta a un matraz de 500 ml, una cantidad de solución del yodo estimada como un exceso sobre la cantidad de sulfuro presente: Añadir agua destilada, si fuera necesario, para llevar el volumen a unos 20 ml. Añadir 2 ml de HCl 6N. Llevar con la pipeta 200 ml de muestra al matraz, descargando la pipeta bajo la superficie de la solución. Si desaparece el color del yodo, añadir más yodo para mantener el color.

Titular por retroceso con solución de tiosulfato sódico, añadiendo unas gotas de solución de almidón al acercarse al punto final, y continuando hasta la desaparición del color azul.

B) Si se ha precipitado el sulfuro de zinc, filtrando ZnS, devuélvase el filtro y precipitado al frasco original y añadir unos 100 ml de agua. Añadir solución de yodo y HCl y valorar como en el apartado anterior.

6. CALCULO

_ Método yodométrico: $\text{mg S}^{2-} / \text{l} = [(A * B) - (C * D)] * 16000 / \text{ml de muestra}$

Donde: A = ml de solución de yodo.

B = normalidad de la solución de yodo.

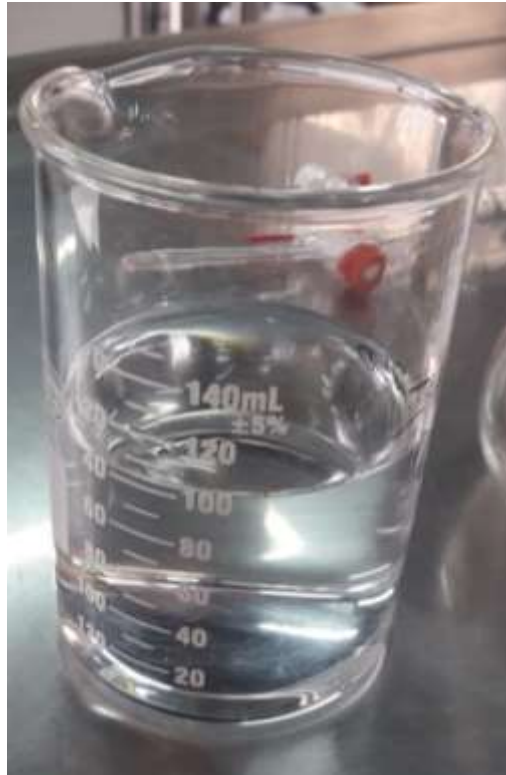
C = ml de solución de tiosulfato sódico.

D = normalidad de la solución de tiosulfato sódico.

Anexo 2. ANALISIS CUANTITATIVO DE PRESENCIA DE SULFUROS

1. Diluir la muestra de hidrolizado 1:10.

1.1. Diluir 10 ml de la muestra y aforar a 100 ml de agua destilada



2.

3. En Erlenmeyer colocar 30 ml de solución KI/I 0,025N.



4. Añadir 2 ml de HCl 6N



5. Añadir 10 ml de la muestra de hidrolizado diluida



6. Titular con solución de tiosulfato de sodio 0,025 N hasta color amarillo pálido.



7. Colocar 1 ml de solución de almidón hasta coloración negra.



8. Continuar la titulación con tiosulfato hasta incoloro.



9. **Calcular la concentración de sulfuros de la muestra 1**

9.1. **Terminado el proceso de adición de 20 gramos Metabisulfito de sodio (2NaHSO_3), en la muestra 1.**



Resultado: 10440 mg/l S⁻² de sulfuros

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = \frac{(V_1 \times C_1) - (V_2 \times C_2) \times 16000 \times f}{\text{ml de la muestra}} =$$

V_1 = ml de la solución de yoduro de potasio (KI/I)

C_1 = Normalidad de la solución (KI/I)

V_2 = ml de la solución Na₂S₂O₃

C_2 = Normalidad de la solución

f = factor de dilución de la muestra

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = \frac{(30 \text{ ml} \times 0.025 - 3.9 \text{ ml} \times 0.025) \times 16000 \times 10}{10 \text{ ml de la muestra}} =$$

S⁻² (mg/l) = 10440 S⁻² mg/l

9.2. Calcular la concentración de sulfuros terminado el proceso de adición de 0.015 gramos (0.075%) de la enzima KINGZIME VP, en la muestra 1.

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = \frac{(20 \text{ ml} \times 0.025 - 6.5 \text{ ml} \times 0.025) \times 16000 \times 10}{10 \text{ ml de la muestra}} =$$

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = 5400 \text{ S}^{-2} \text{ mg/l}$$

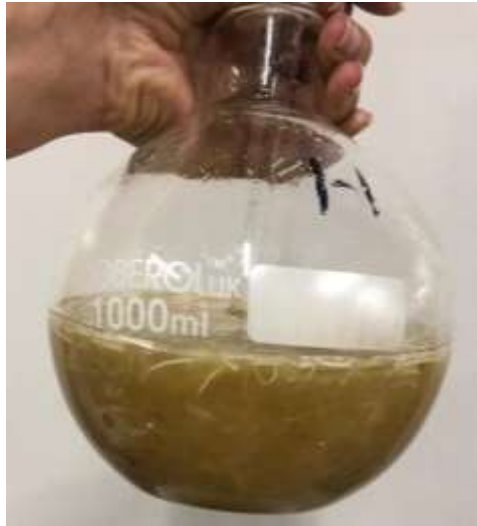


10. Calcular la concentración de sulfuros de la muestra 2

10.1. Terminado el proceso de adición de 12 gramos sulfuro de sodio (NaCL), en la muestra 2.

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = \frac{(10 \text{ ml} \times 0.025 - 2.2 \text{ ml} \times 0.025) \times 16000 \times 10}{10 \text{ ml de la muestra}} =$$

$$S^{-2} \text{ (mg/l)} = 3120 \text{ S}^{-2} \text{ mg/l}$$



10.2. Calcular la concentración de sulfuros terminado el proceso de adición de 20 gramos Metabisulfito de sodio (2NaHSO_3), en la muestra 2.

$$\text{S}^{-2} \text{ (mg/l)} = \frac{(30 \text{ ml} \times 0.025) - (1.7 \text{ ml} \times 0.025) \times 16000 \times 10}{10 \text{ ml de la muestra}} =$$

$$\text{S}^{-2} \text{ (mg/l)} = 11320 \text{ S}^{-2} \text{ mg/l}$$



11. Resumen de resultados

Resultados de concentración de sulfuros S^{-2} mg/L		
	Muestra 1	Muestra 2
Sulfuro de sodio	--	3120

Metabisulfito de Sodio	10440	11320
Enzima KINGZYME VP	5400	--

Anexo3: Reactivos para pruebas en celdas Conway

- A. Indicador Mixto: En un matraz volumétrico de 100 ml pesar 0.033 g del indicador verde de Bromocresol y diluir en Etanol 0.066 g de Rojo de Metilo para finalmente aforar con Etanol al 95% la mezcla preparada.

- B. Ácido Bórico: pesar 10 g de ácido bórico, en un matraz volumétrico de 1 L y diluir en 700 ml de agua destilada. Agregar a la mezcla los 200 ml de Etanol al 95% y 10 ml de indicador mixto, para finalmente aforar con agua destilada.

- C. Hidróxido de potasio: disolver 100 g de hidróxido de potasio (KOH), para evitar la absorción de CO₂, calentar los 200 ml de agua destilada para disolver

- D. Ácido Clorhídrico a 0.01 N: en un matraz aforado de 1 L, añadir 0.83 ml de ácido clorhídrico, para aforar con agua destilada.

Anexo 4: Secuencia de cálculos de grado de hidrolisis

- I. Transformación de número de [*mg de NH₂ libres/ml de hidrolizado*], producto de hidrólisis, a [*g de NH₂ libres/ml de hidrolizado*]

- II. Calcular la cantidad de grupos amino que pueden liberarse en la proteína, por medio de la caracterización. La cantidad de proteína corresponde a la cantidad de nitrógeno proteico por el factor de 6.25 (Tacon, A. G., 1989)

PARAMETRO	METODO	UNIDADES	RESULTADO
*Proteína	POE: 5.4.91 AOAC 2001.11	% p/p	75.43

Figura 1: Resultados Analíticos de la pluma.

Tomado de (Andrade, V. & Belén, M., 2018).

$$75,43\% \text{ p/p} = 0,7543 \frac{\text{g de proteína}}{\text{g pluma seca}}$$

$$\text{N proteico total} = \frac{0,7543 \frac{\text{g de proteína}}{\text{g pluma seca}}}{6,25} = 0,120688 \frac{\text{g N proteico total}}{\text{g de pluma seca}}$$

- III. Asume que el nitrógeno proteico proviene enteramente de los grupos amino de la proteína, existen 14 g N proteico en 16 g NH₂ porque en pluma seca hay un total de:

$$0,120688 \frac{\text{g N proteico total}}{\text{g de pluma seca}} * \frac{16 \text{ g NH}_2}{14 \text{ g N proteico}} = 0,1379290 \frac{\text{g de NH}_2 \text{ totales}}{\text{g de pluma seca}}$$

Anexo 5: Calculo de grado de hidrolisis

- I. Se calcula el grado de hidrolisis en porcentaje, dividiendo la concentración de grupo amino libres resultados de hidrolisis, para la cantidad de amino libres totales:

II.

$$^{\circ}H = \frac{C \left[\frac{g \text{ NH}_2 \text{ libres}}{g \text{ de pluma seca}} \right]}{0.137929 \frac{g \text{ NH}_2 \text{ totales}}{g \text{ de pluma seca}}} * 100$$

- III. Gasto de HCL: $50 \mu l \rightarrow 0.05 \text{ ml}$

$$\begin{aligned} mg &= 0.05 \text{ ml de HCl } 0.01N * \frac{0.16009 \text{ mg de NH}_2 \text{ libres}}{1 \text{ ml de HCl } 0.001N} \\ &= 0.0080045 \text{ mg de NH}_2 \text{ libres} \end{aligned}$$

$$g = 0.0080045 \text{ mg de NH}_2 \text{ libres} * 0.001 \frac{g \text{ de NH}_2 \text{ libres}}{mg \text{ de NH}_2 \text{ libres}}$$

$$= 8.0045 * 10^{-6} \text{ g de NH}_2 \text{ libres}$$

$$C = \frac{8.0045 * 10^{-6} \text{ g de NH}_2 \text{ libres}}{\text{ml hidrolizado}} * \frac{500 \text{ ml de solución}}{20 \text{ g plumas secas}}$$

$$= 2.001 * 10^{-4} \frac{g \text{ de NH}_2 \text{ libre}}{g \text{ plumas secas}}$$

- IV. Cantidad total de grupo amino liberados: $0.1379290 \frac{g \text{ de NH}_2 \text{ totales}}{g \text{ de pluma seca}}$

$$^{\circ}H = \frac{2.001 * 10^{-4} \frac{g \text{ de NH}_2 \text{ libre}}{g \text{ plumas secas}}}{0.137929 \frac{g \text{ de NH}_2 \text{ libre}}{g \text{ plumas secas}}} * 100 = \mathbf{0.145}$$

Muestra de queratina	Gasto de HCL ml	C (Concentración de grupo amino libres)		$^{\circ}H$

4-a	0.05	8.0045E-06	0.00020011	0.1450837
4-b	0.05	8.0045E-06	0.00020011	0.1450837
4 c	0.05	8.0045E-06	0.00020011	0.1450837
1-a	0.02	3.2018E-06	8.0045E-05	0.05803348
2-b	0.02	3.2018E-06	8.0045E-05	0.05803348

Anexo 6: Ficha técnica de la enzima KYGZYME VP

Product Information

KINGZYME VP *An Innovative Keratinase*

Description

Kingzyme VP is a keratinase enzyme preparation developed according to characteristics of animal by-product raw materials and their different processing methods. Kingzyme VP mainly composed of endonuclease, exonuclease and other components. It can hydrolyse feather keratin, decomposition of macromolecule proteins into required peptide, small peptide, amino acid products, to improve product yield, Solubility, flavor, taste. It can be widely used to make high quality food ingredients, biochemical pharmaceutical, and feed.

Specification: with activity not less than 100,000U/g

Application

- Hydrolysis poultry feather, swine and cattle hair produce animal protein feed.
- Feather powder hydrolysis produce high level protein feed.
- Hydrolysis animal hair produce compound amino acids.

Advantages

- High hydrolysis yields
- Good taste and palatability of final product
- Improve product digestibility and absorption rate.
- Green and safe.

Caution

This product may cause dermal and respiratory irritation and/or sensitivity. Appropriate protective equipment must be worn during handling.

Packing

25 kg/bag

Storage

The product should be stored in a cool dry environment without exposure to direct sunlight. Shelf life is minimum 12 months from production date, can be extended in original package stored under 25 °C.

Quality

The manufacturing plant has been authorized by the China authority for food, feed additive production, and has been certified of GMP+, ISO 9001:2008, ISO22000-2006 (HACCP), to control the quality through the whole production procedure.

Technical Service

Vland Biotech Group is happy to assist our customers with the use of our products for applications development.



QINGDAO VLAND BIOTECH GROUP CO., LTD.
Rm.12A05, No.29 Miaoling Road, Qingdao, China
+86 532 8896 9585 | <http://www.vlandgroup.com>

ANEXO 7. Composición del humus

Composición del humus

Elemento	Unidad	Contenido
Nitrógeno (N)	%	0.35-0.5
Fosforo (P ₂ O ₅)	%	0.05-0.25
Potasio (K ₂ O)	%	0.09-1.5
Calcio (CaO)	%	0.5-1.5
Magnesio (MgO)	%	0.3-1.3
Hierro (Fe)	%	1-1.5
Cobre (Ca)	%	15-25
Zinc (Za)	%	12-210
Manganeso (Ma)	mg/kg	180-300
Materia orgánica	%	15-18
pH		0.5-1.1
Conductividad eléctrica	ds/cm	450-1300

